Novi 1,2,3-triazolni derivati kumarina: sinteza Pd-kataliziranim i "klik" reakcijama, spektroskopska svojstva i antitumorska aktivnost

Krnić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:426693

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Krnić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Krnić

NOVI 1,2,3-TRIAZOLNI DERIVATI KUMARINA: SINTEZA Pd-KATALIZIRANIM I „KLIK“ REAKCIJAMA, SPEKTROSKOPSKA SVOJSTVA I ANTITUMORSKA AKTIVNOST

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc.Tatjana Gazivoda Kraljević

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc.dr. sc.Tatjana Gazivoda Kraljević
2. prof.dr.sc. Silvana Raić-Malić
3. dr.sc. Lidija Furač, viši predavač

Zagreb, srpanj 2016.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Tatjani Gazivoda Kraljević na spremnosti da mi bude mentor, pruženom povjerenju, vodstvu, stručnim savjetima i pomoći tokom izrade ovog rada. Hvala na prenesenom znanju tijekom čitavog studija, na susretljivosti i strpljivosti.

Veliko hvala svim djelatnicima i kolegama studentima Zavoda za organsku kemiju, na nesebičnoj pomoći, savjetima i vremenu koje su odvojili za mene tijekom izrade ovog rada.

Na kraju, želim zahvaliti mojim roditeljima, sestrama i Denisu koji su uvijek bili uz mene i bezuvjetno me podržavali tijekom mog školovanja.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-5596.

SAŽETAK

U ovom je radu prikazana sinteza, spektroskopska karakterizacija i *in silico* analiza C-3 supstituiranih 1,2,3-triazolnih i alkinilnih derivata kumarina (**3-22**). Početni spoj za „klik“ reakcije, 3-azido-7-hidroksikumarin (**2**) pripravljen je Perkinovom reakcijom. U položaj C-3 kumarinskog prstena uvedeni su 1,2,3-triazolni supstituenti mikrovalovima potpomognutim „klik“ reakcijama s odgovarajućim terminalnim alkinima uz Cu katalizator pri čemu su sintetizirani spojevi (**3-20)**. Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim arilnim terminalnim alkinima uz katalizator $Pd(PPh_3)_4$ i CuI kao kokatalizator pripravljeni su 3-ariletinil-7-hidroksi-4-metil kumarini **21** i **22**. „One-pot“ reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina, NaN_3, L-prolina i NaOH nije sintetiziran 3-azido-7-hidroksi-4-metilkumarin koji je trebao poslužiti kao početni spoj za „klik“ reakcije. Strukturna i spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je ^{1}H NMR, UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. *In silico* analizom (PASS) predviđene su farmakološke aktivnosti i moguće biološke mete novopripravljenih spojeva.

Ključne riječi: derivati 7-hidroksikumarina, 1,2,3-triazol, „klik“ reakcija, Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja, Perkinova reakcija.

SUMMARY

This paper describes synthesis, spectroscopic characterization and *in silico* analysis of C-3 substituted 1,2,3-triazole and alkynyl coumarin derivatives (**3-22**). Starting compound for „click“ reactions, 3-azido-7-hydroxycoumarin (**2**) was prepared by Perkin reaction. In position C-3 of coumarin ring were introduced 1,2,3-triazole substituents with Cu-catalyzed „click“ reactions under microvawe irradiation with corresponding terminal alkynes whereby compounds (**3-20**) were synthesized. Compounds of 3-arylethynyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin (**21-22**) were prepared by Sonogashira cross-coupling reaction with corresponding aryl terminal alkynes, catalyst $Pd(PPh_3)_4$ and cocatalyst CuI. „One-pot“ reaction with mixture of 7-hydroxy-3-chlor-4-methylcoumarin, NaN_3, L-prolin and NaOH was not successful for synthesis starting compound for „click“ reactions, 3-azido-7-hydroxy-4-methylcoumarin. Structural and spectroscopic characterization of 1,2,3-triazole coumarin derivatives was conducted using ^{1}H-NMR, UV/Vis and fluorescence spectroscopy. Pharmacological effects and possible biological targets for novel synthesized compounds were provided using *in silico* analysis (PASS).

Key words: 7-hydroxycoumarin derivatives, 1,2,3-triazole, „click“ reaction, Sonogashira cross-coupling reaction, Perkin reaction.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Kumarini i kumarinski analozi 3
2.2. 7-hidroksi derivati kumarina 17
2.3. Sinteza kumarina 20
2.4. 1,2,3-triazol kao farmakofor 22
2.5. "Klik" kemija 25
2.6. Sonogashira-ina reakcija 27
2.7. UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija 29
2.8. Predviđanje spektra aktivnosti spojeva *in silico* analizom (PASS) 32
3. EKSPERIMENTALNI DIO 34
3.1. Opće napomene 34
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva 35
3.3. Priprava spojeva 36
4. REZULTATI I RASPRAVA 45
4.1. Sinteze spojeva 45
4.2. Strukturna karakterizacija novopripravljenih spojeva ^{1}H NMR spektroskopijom 49
4.3. Spektroskopska karakterizacija spojeva UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom 55
4.4. *In silico* analiza novopripravljenih spojeva (1-19) 58
5. ZAKLJUČCI 64
6. LITERATURA 65
7. ŽIVOTOPIS 68
8.PRILOZI 69

1.UVOD

Prema dostupnim podatcima svjetske literature iz područja biologije stanica raka, tumori su po učestalosti drugi uzrok smrtnosti, odmah nakon bolesti srca i krvnih žila. Provode se brojni eksperimenti kako bi se razvili spojevi s minimalnim brojem nuspojava ili bez njih. U skladu s navedenim, u posljednje vrijeme sve se više razvija molekularno ciljana terapija pomoću koje se blokira rast i širenje raka ubacivanjem specifičnih molekula ("molekularnih meta") koje su uključene u rast, napredovanje i širenje raka. Ciljane terapije su promišljeno izabrane i dizajnirane za određene molekule koje su povezane s rakom, dok većina standardnih kemoterapija djeluje na sve, normalne i rakom zahvaćene stanice.[1]

Zahvaljujući svojim brojnim biološkim svojstvima, kumarini i njihovi derivati predstavljaju veliki interes brojnih farmakologa i medinskih kemičara u dizajniranju novih lijekova na osnovi prirodnih kumarina i njihovih sintetiziranih analoga. Kumarini i njihovi derivati pokazuju antimikrobnu, protuupalnu, antikoagulacijsku, antitumorsku, antivirusnu, analgetsku i hipotermičku biološku aktivnost, a djeluju i kao antidepresivi, sedativi, hipnotici i antihelmintici. Spojevi s kumarinskom jezgrom imaju i široku primjenu kao aditivi u hrani, u kozmetičkim preparatima i luminiscentnim materijalima.[2]

U posljednjih nekoliko godina sve je veći naglasak na derivatima kumarina konjugiranim s 1,2,3-triazolima. 1,2,3-triazoli su trenutno jedna od najvažnijih heterocikličkih klasa spojeva u području medicinske kemije zbog prisutnih dušikovih atoma koji im omogućuju stvaranje vodikovih veza s biomolekulskim metama, a to ih pak čini izuzetno biološki aktivnima. Derivati 4-((1,2,3-triazol-1-il)metil) kumarina pokazuju antitumorsku aktivnost inducirajući apoptozu tumorskih stanica. Osim toga, analozi novobiocina s 1,2,3-triazolnim prstenom u C-3 položaju kumarina pokazuju potencijalno citotoksično djelovanje protiv raka dojke (SKBr-3 i MCF-7). Također, spojevi s 1,2,3-triazolom u C-3 položaju na kumarinu sprječavaju i nakupljanje β-amiloida koji imaju ključnu patogenu ulogu u razvoju Alzheimerove bolesti.[3]

Poznavajući važnost kumarina i farmakološka svojstva 1,2,3-triazola osnovni cilj bio je povezati navedene biomolekule kako bi dobili seriju novih spojeva s potencijalnom antitumorskom aktivnošću. Novi 1,2,3-triazolni derivati kumarina sintetizirani su „klik" reakcijama kumarinskih azida i terminalnih alkina uz Cu(I) kao katalizator pri čemu nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. „Klik" reakcije imaju široku primjenu u organskoj kemiji zbog primijenjenih jednostavnih reakcijskih uvjeta, visokih iskorištenja, lako dostupnih reagenasa, lake izolacije produkata, stereospecifičnosti i bezopasnih nusprodukata.[4]

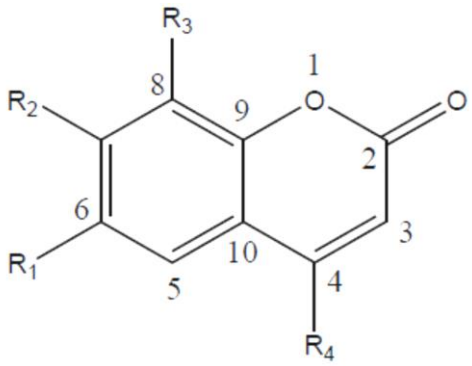
Osim „klik“ reakcijama, utvrđeno je da reakcije uz Pd katalizatore predstavljaju učinkovite metode u sintezi kumarinskih derivata s alkinilnim supstituentom. Primjer je Pd-katalizirana Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja pri čemu nastaju alkinilni derivati kumarina s antihelmintskim, hipnotičkim i insekticidinim svojstvima.

U ovom diplomskom radu sintetizirani su „klik“ i Sonogashira-inom reakcijom novi derivati kumarina supstituirani u položaju C-3 1,2,3-triazolnim ili ariletinilnim supstituentom, a njihova će antitumorska aktivnost na staničnim tumorskim linijama porijeklom iz čovjeka biti naknadno ispitana.

2.OPĆI DIO

2.1. KUMARINI I KUMARINSKI ANALOZI

Kumarini (2*H*-1-benzopiran-2-on) pripadaju klasi heterocikličkih spojeva s benzo-α-pironskom jezgrom (Slika 1). Pronađeno je više od 1300 kumarina kao sekundarnih metabolita brojnih biljaka, bakterija i gljiva. Kumarin je prvi put izoliran iz plodova tropskog drveta tonkovca *Coumarouna odorata Aube (Dipteryx odorata)* 1820. g., po kojem je i dobio ime (Slika 2).



Slika 1. Struktura kumarina





Slika 2. Drvo tonkovca *Dipteryx odorata* i plodovi tonkovca

Kumarine nalazimo u 150 različitih biljnih vrsta koje su raspodijeljene u čak 30 različitih obitelji od kojih su najznačajnije: Rutaceae, Umbelliferae, Clusiaceae, Guttiferae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Nyctaginaceae i Apiaceae. Iako se kumarini nalaze u svim dijelovima biljaka, u najvećoj mjeri se javljaju u plodovima i to jagoda, trešanja, borovnica, marelica, višnji, cimetu, lavandi, slatkoj djetelini, u tonka sjemenkama, lazarkinji, bizonskoj i gospinoj travi (Slika 3.). Kumarine nalazimo u većoj količini i u nekim eteričnim uljima, osobito ulju cimeta i lavandinom ulju.[5]



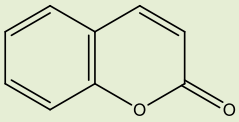
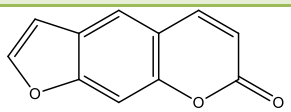
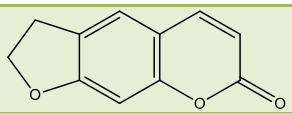
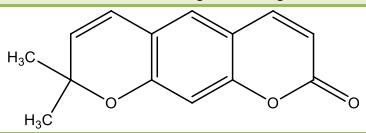
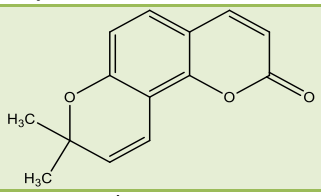
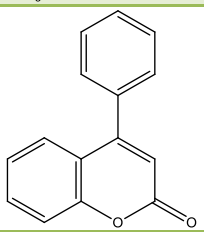
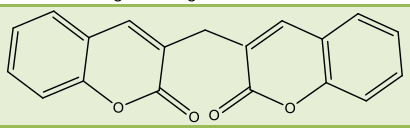
a) b) c)

Slika 3. Prirodni izvori kumarina: (a) slatka djetelina, (b) lavanda i (c) jagoda

Miris kumarina podsjeća na vaniliju, koji neki autori karakteriziraju i kao miris na svježe pokošenu travu. S obzirom da na kumarinskom prstenu postoji 6 položaja koji se mogu supstituirati, poznato je mnoštvo različitih derivata kumarina, bilo sintetskih ili prirodnih, a takva strukturna raznolikost uzrok je mnoštvu različitih bioloških aktivnosti. Prisutnost kumarinskih derivata u biljkama je vrlo česta, a mnoge od tih biljaka se upotrebljavaju u tradicionalnoj medicini od davnina. Kumarin se koristi kao sredstvo za fiksiranje i pojačavanje u parfemima, dodaje se sapunu i detergentima, pasti za zube, duhanskim proizvodima i nekim alkoholnim pićima, koristi se kao zaslađivač i pojačivač prirodnih ulja. Kako se često koristi kao mirisno sredstvo, kumarini zauzimaju 57% od 73 ispitanih deodoranasa na europskom tržištu prema podatcima iz 1998.g.[6]

Prirodni kumarini se obično klasificiraju u 6 skupina prema kemijskoj strukturi spojeva.[5]

Tablica 1. Različite vrste kumarina, njihove kemijske strukture i primjeri:

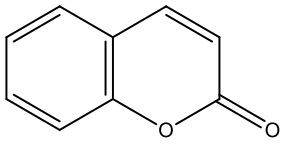
Vrsta kumarina	**Opća kemijska struktura**	**Primjeri**
1. Jednostavni kumarini		Kumarin Eskuletin Amoresinol Ostrutin Ostol Novobiocin Kumermicin Kartreuzin Fraksin Umbeliferon Fraksidin Felodenol A Eskulin, fraksetin
2. Furanokumarini		Imperatorin Psoralen Bergapten Metoksalen Marmald, marmelosin
3. Dihidrofuranokumarini		Antogenol Felamidin Marmesin, rutaretin
4a. Piranokumarini (linearni)		Grandivitin Agasilin Agelinol benzoat Ksantiletin
4b. Piranokumarini (angularni)		Inofilum A, B, C, E, P, G_1 i G_2 Kalanolid A, B i F (+)-Dihidrokalanolid A i B Pseudokordatolid C
5. Fenilkumarini		Izodispar B, dispardiol B, mamea A/AB ciklo E, mamea A/AB dioksalanciklo F, disparinol D, disparpropilinol B
6. Bikumarini		Dikumarol

Fizikalno-kemijska svojstva kao i terapeutska primjena prirodnih kumarina ovisi o vrsti supstituenta i položaju supstitucije.

Derivati kumarina pokazuju brojne biološke aktivnosti uključujući antimikrobnu, antitumorsku, anti-HIV, protuupalnu, antikoagulacijsku, antioksidacijsku, analgetsku i hipotermičku aktivnost.[2]

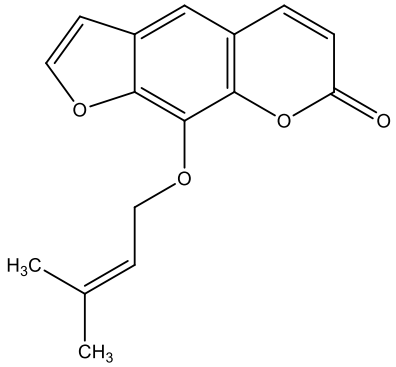
Derivati kumarina s protuupalnom aktivnošću:

Kumarin (**1**) pokazuje protuupalno djelovanje i upotrebljava se u liječenju edema tako što uklanja višak nakupljene tekućine unutar ozlijeđenog tkiva stimulirajući fagocitozu, proizvodnju enzima i njihovu proteolizu.[7]



1

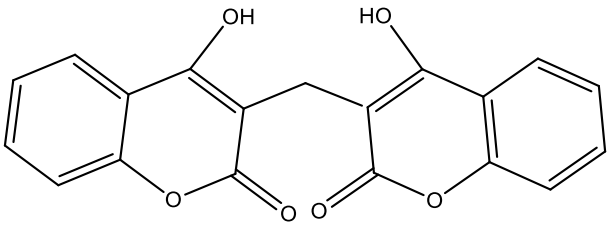
Imperatorin (**2**) je također poznati protuupalni agens, izoliran iz biljke *Urena lobata*, koji stimulira aktivaciju makrofaga (RAW264.7) zaslužnih za čišćenje organizma od otpadnih čestica i borbe protiv stranih tvari (antigena).[8]



2

Derivati kumarina s antikoagulacijskom aktivnošću:

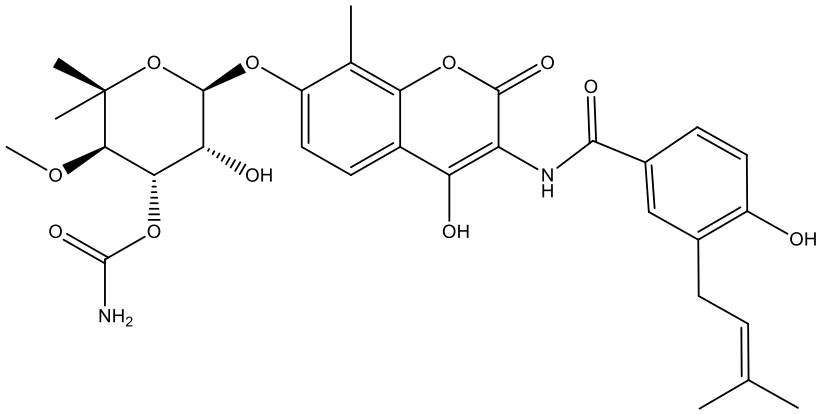
Dikumarol (**3**) je otkriven u plijesni slatke djeteline i prirodno se pojavljuje kao antikoagulans. Dikumarol djeluje kao antagonist vitamina K inbibirajući sintezu protrombina u jetri čime se produžava vrijeme normalne koagulacije krvi. Protrombin izaziva grušanje krvi jer se pretvara u netopljivi trombin.[9]



3

Derivati kumarina s antibakterijskom aktivnošću:

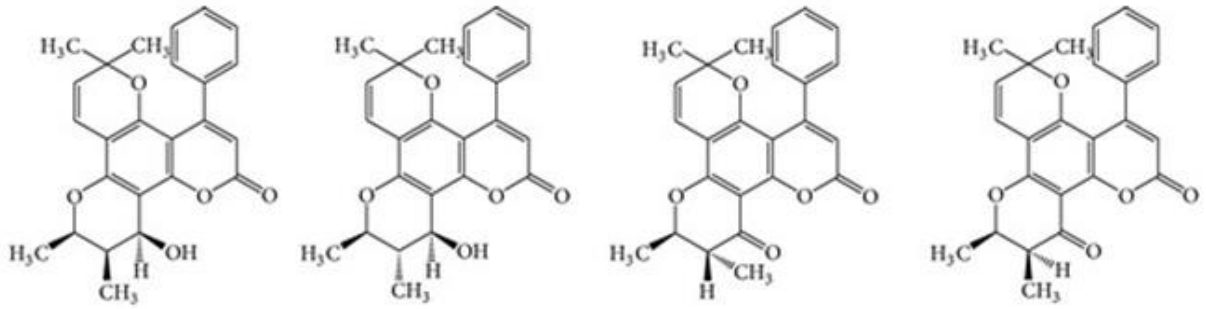
Novobiocin (**4**) je izoliran iz *Streptomyces niveus* i *Streptomyces spheroides* kao fungalni metabolit, a pokazuje širok spektar antibakterijske aktivnosti prema Gram-pozitivnim bakterijama kao što su: *Corinebacterium diphtheria*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pneumoniae*, i *Streptomyces* i prema Gram-negativnim bakterijama kao što su: *Haemophillus influenza*, *Nesseria meningitides* i *Pasteurella.* Novobiocin se primjenjuje kao antibiotik prirodnog porijekla na bazi kumarina, a osim antibakterijskog učinka djeluje i kao inhibitor DNA-giraze.[10]



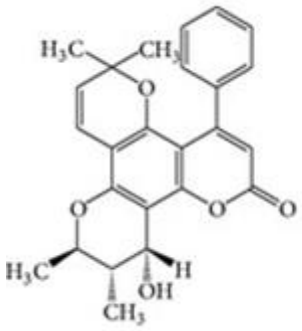
4

Derivati kumarina s antivirusnom aktivnošću:

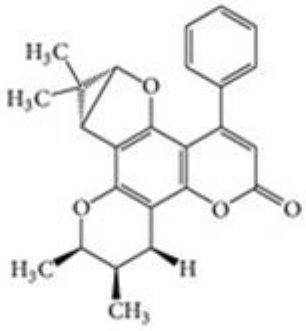
Inofilumi i kalanolidi predstavljaju nove derivate kumarina koji su inhibitori HIV-virusa. Inofilum A (**5**), inofilum B (**6**), inofilum C (**7**), inofilum E (**8**), inofilum P (**9**), inofilum G1 (**10**) i inofilum G2 (**11**) su izolirani iz divovskog afričkog puža *Achatina fulica.* Inofilum B i P (**6** i **9**) inhibiraju reverznu transkriptazu HIV-a tipa 1.[11]



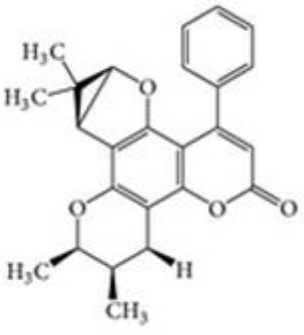
5 **6** **7** **8**



9



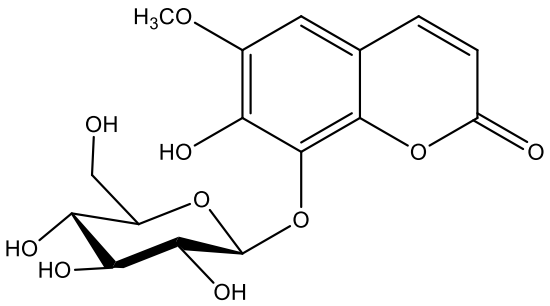
10



11

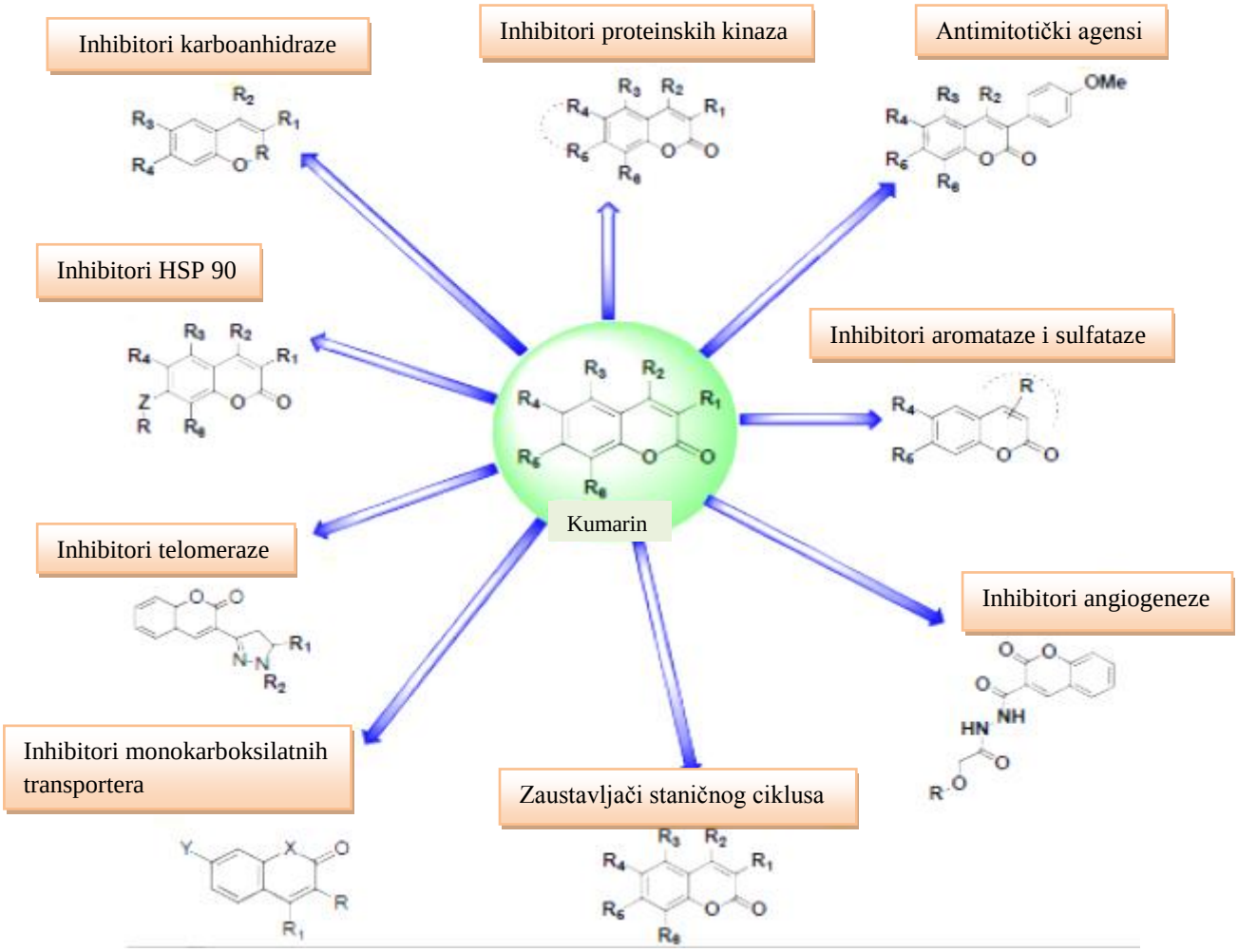
Derivati kumarina s antioksidativnom aktivnošću:

Fraksin (**12**) pokazuje sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala kisika pri vrlo visokim koncentracijama (0,5 mM) i štiti stanice od oksidativnog stresa. Eskuletin također pokazuje antioksidativna svojstva. Fraksin je pronađen u stablu i plodovima kivija, *Actinidia deliciosa* i *Actinidia chinensis.*[12]



12

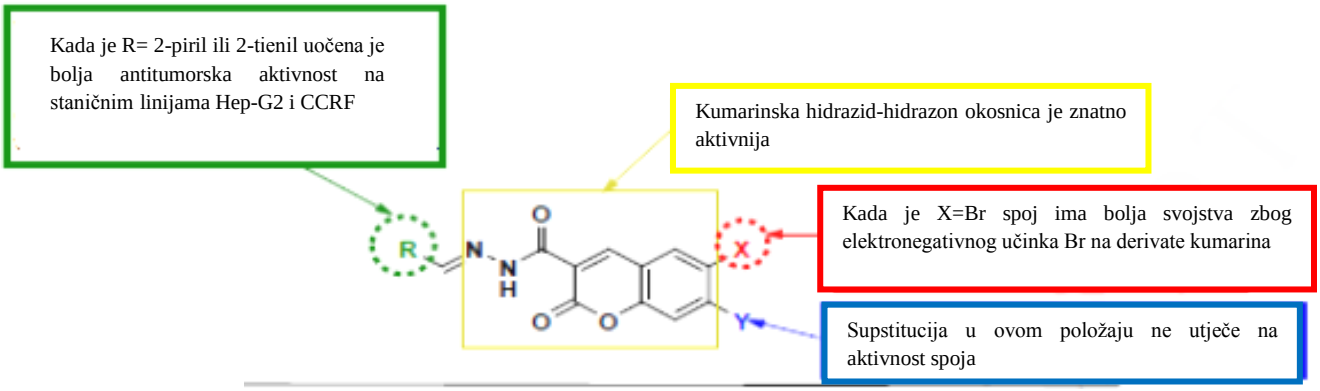
Derivati kumarina s antitumorskom aktivnošću:

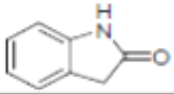


Slika 4. Derivati kumarina s antitumorskom aktivnošću

1) Inhibitori proteinskih kinaza – kinaze su enzimi koji kataliziraju prijenos fosfatne skupine na određeni protein. Proteinske kinaze imaju ključnu ulogu u prijenosu signala tijekom rasta stanica i diferencijacije. Aktivirani oblici kinaza mogu prouzročiti povećanje stanične proliferacije, spriječiti staničnu apoptozu, unaprijediti angiogenezu i metastazu u brojnim tumorskim stanicama zbog čega je aktivirana proteinska kinaza, uslijed somatskih mutacija, osnovni mehanizam nastanka tumora. S obzirom da se navedeni efekti javljaju kao posljedica aktivacije kinaza, upravo su one ciljana meta za inhibiciju pomoću kumarina i njihovih derivata.[13]

U tu svrhu 2014. god. sintetizirani su i ispitani derivati kumarina s antitumorskom aktivnošću protiv rezistentnih stanica gušterače tipa Hep-G2 i CCRF. Dokazano je da spojevi **a-d** pokazuju znatno veću antitumorsku aktivnost od trenutno dostupnog kemoterapeutskog lijeka doksorubicina (Slika 5.).[14]

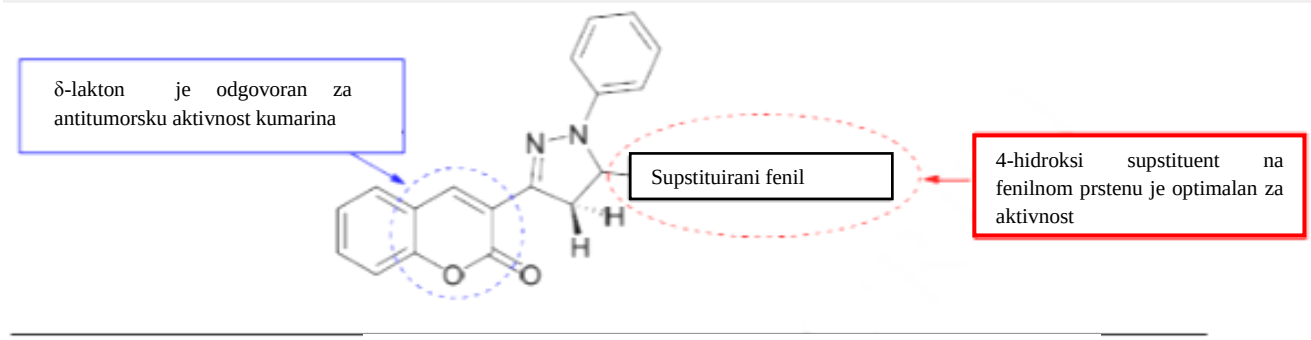


Spoj	R	X	Y	IC_{50} (μM)		
				Hep-G2	Panc-1	CCRF
a		Br	H	3.60	6.50	5.15
b		Br	H	2.02	-	-
c		Br	H	4.18	-	9.02
d		Br	H	2.10	-	-

Slika 5. SAR analiza hidrazid-hidrazon derivata kumarina

2) Zaustavljači staničnog ciklusa – kumarini imaju sposobnost zaustaviti različite faze staničnog ciklusa kao što su G0, G1, S i M faza što na kraju vodi do apoptoze stanica. Kumarini potiču apoptozu djelujući na enzime kaspaze i izmjenjujući proteine obitelji Bcl-2 na staničnoj razini. Mitohondrijski potencijal se iscrpljuje uslijed povećanog oslobađanja proapoptičkih gena Bax/Bak, koji su dio obitelji Bcl-2 proteina, i unutarstaničnih slobodnih radikala kisika (ROS). To dovodi do otpuštanja citokroma c iz mitohondrija i potiskivanja matriksa metaloproteinaze u citoplazmu što pak dovodi do aktivacije enzima kaspaze-9 i kaspaze-3/7. Time su tumorski protein p53 i njegova transkripcijska meta PUMA regulirani. PUMA stupa u interakciju s antiapoptičkim proteinima obitelji Bcl-2 dovodeći do aktivacije gena Bax/Bak. Navedeni mehanizam ima ključnu ulogu u višestrukim modelima kojima se inducira apoptoza stanica.[15]

U tu svrhu sintetizirani su derivati kumarina s δ-laktonskim prstenom koji posjeduje impresivnu atitumorsku aktivnost inducirajući zaustavljanje G1 faze staničnog ciklusa. Derivat kumarina s 4-hidroksi supstituentom na fenilnom prstenu je trenutno najsnažniji antitumorski agens s minimalnim prosječnim postotkom rasta ispitivanih stanica (Slika 6.).[16]

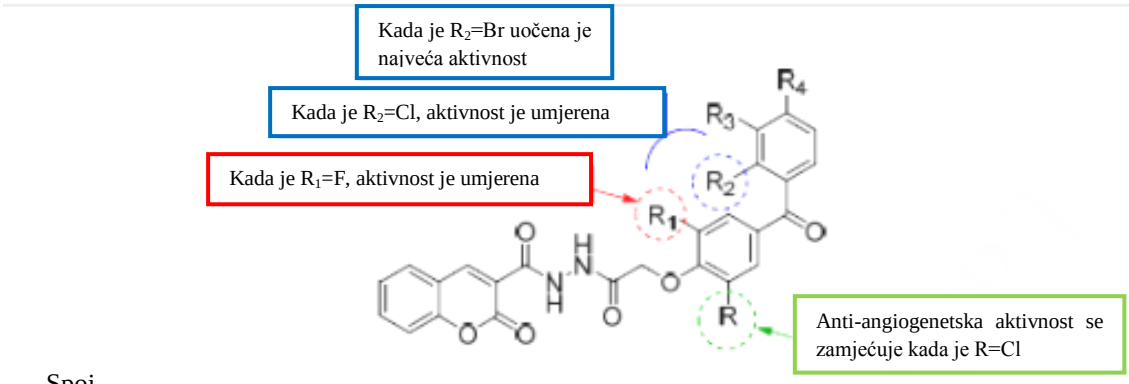


Supstituent	Ispitivanje provedeno na 60 staničnih linija koncentracije 10^{-5}			
	% rasta	Raspon % rasta	Najosjetljivije stanične linije i njihov rast	
-4hidroksi	77.59	-67.37 to 78.46	MDA-MB-231/ATCC	-67.37
	77.59	-65.18 to 78.46	CAK-1	-65.18
	77.59	-63.77 to 78.46	UO-31	-63.77
	77.59	-67.37 to 78.46	NCI-H522	-67.37

Slika 6. SAR analiza derivata 3-(4,5-dihidro-1-fenil-5-supstituirani fenil-1*H* pirazol-3-il)-2*H*-kromen-2-ona

3) Inhibitori angiogeneze – angiogeneza je najistaknutije područje djelovanja derivata kumarina. Kumarini sprječavaju pojavu angiogeneze inhibirajući fibroblastni faktor rasta-2 (FGF-2) koji posreduje u proliferaciji stanica, njihovoj migraciji i formiranju tubula. Štoviše, opaženo je da derivati kumarina smanjuju ekspresiju vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i fosforilaciju IKKα.[17]

Veliki broj derivata kumarina, kao inhibitora angiogenze, je sintetiziran, među kojima najznačajniji benzofenon-konjugirani analozi kumarina. SAR analiza potvrđuje da spoj **13** koji ima brom u *ortho* položaju na fenilnom prstenu sadrži najveću anti-angiogenetsku aktivnost uspoređujući spoj **14** s klorom i fluorom u *ortho* položaju na fenoksi prstenu i metilnom grupom u *para* položaju na benzoilnom prstenu i spoj **15** s dva klora u *ortho* položaju na fenoksi prstenu (Slika 7.).[18]

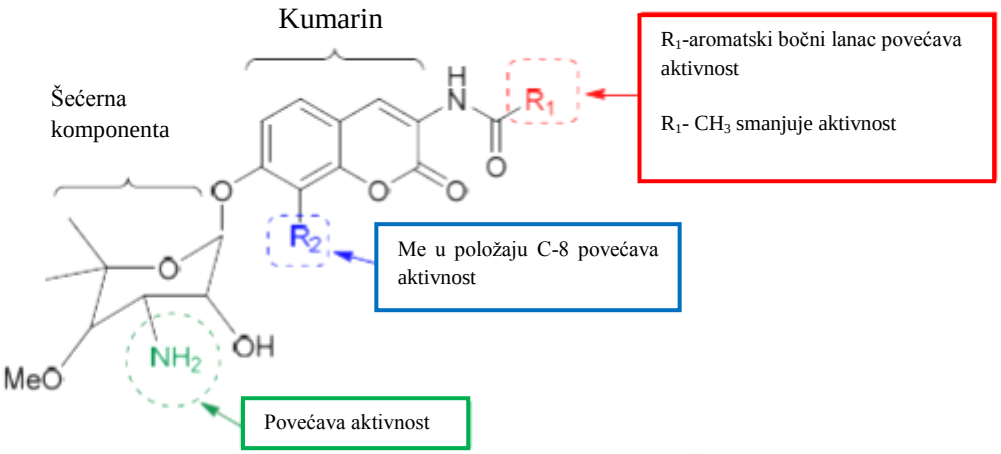


Spoj	R_1	R_2	R_3	R_4	R	Tripan blue test IC_{50} (μM)	MTT test IC_{50} (μM)	CAM test za angiogenezu
13	H	Br	H	H	CH_3	7.7±0.09	7.6±0.10	Regresija krvnih žila
14	F	H	H	CH_3	Cl	9.4±0.02	9.3±0.04	Regresija krvnih žila
15	H	Cl	H	Cl	CH_3	10.4±0.08	10.2±0.12	Regresija krvnih žila
Standard						11.4±0.06	11.4±0.0	—

Slika 7. SAR analiza benzofenon-konjugiranih analoga kumarina

4) Inhibitori HSP 90 (*eng.Heat Shock Protein* - proteini toplinskog stresa) – kumarini se direktno vežu na protein HSP 90 te uzrokuju degradaciju njegovih košaperona što dovodi do antiproliferacijskih efekata. Također, kumarini uzrokuju osiromašenje ključnih regulatornih HSP 90-ovisnih kinaza uključujući Src, Raf-1 i ErBB2.[19]

Slijedeći SAR analizu zaključeno je da se uvođenjem amino skupine na šećernu komponentu kumarinskog derivata povećava antitumorska aktivnost spoja. Spoj s 3-benzamido supstituentom pokazuje veći antiproliferacijski učinak od spoja s 3-acetoamino supstituentom koji je gotovo inaktivan. Nadalje, supstitucija u položaju C-8 i zamjena 3'-OH sa 3'-NH_2 pokazuje veći antitumorski učinak za ciljane HSP 90 proteine. Spoj **17** sa CH_3 skupinom u položaju R_2 je znatno jači antitumorski aminokumarinski analog od spoja **16** s klorom u položaju R_2 (Slika 8.).[20]

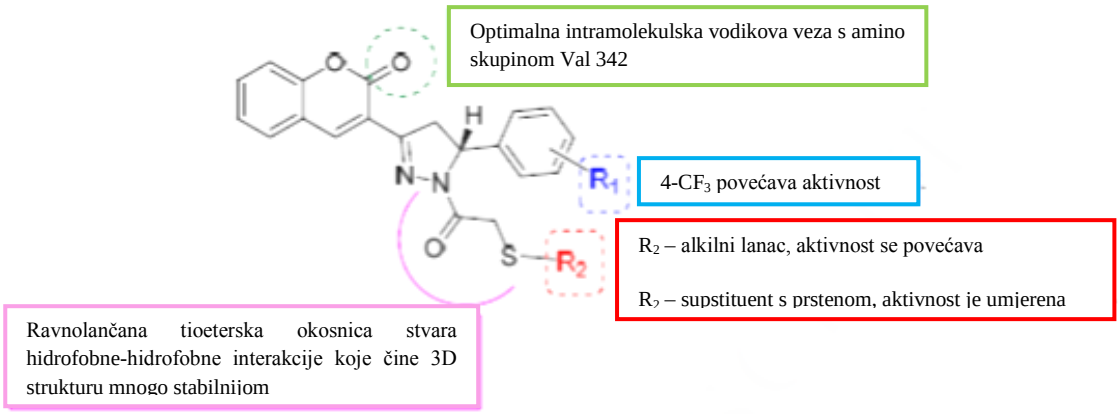


			$IC_{50}(\mu M)/L$			
Spoj	R_1	R_2	A2780	HeLa	Kctr 3	MCF-7
16	Ph	Cl	2.83	5.35	14.60	13.84
17	Ph	Me	7.52	2.89	2.14	8.12

Slika 8. SAR analiza analoga aminokumarina koji sadrže šećerne komponente

5) Inhibitori telomeraze – telomeraza je enzim koji pomaže u održavanju duljine telomera u ljudskim matičnim stanicama kao i u stanicama tumora dodavajući DNA sekvencu TTAGGG na krajeve kromosoma, telomere. Upravo kod tumorskih stanica je uočena aktivnost telomeraze. Različiti inhibitori, uključujući i kumarine, su promatrani kao inhibitori telomeraze u procesu pronalaska spojeva s antitumorskom aktivnošću.[21]

Među svim trifluorometilfenil-kumarin-dihidropirazol sintetiziranim derivatima kumarina, spoj **18** posjeduje visoku antiproliferacijsku aktivnost i djeluje kao inhibitor telomeraze na različitim staničnim linijama. Inbitornu aktivnost spoju **18** daje dihidropirazolni prsten koji se smješta unutar hidrofobnog područja telomeraze koja se sastoji od: Tyr 217, Leu 220, Thr 226 i Ser 227 (Slika 9.).[22]

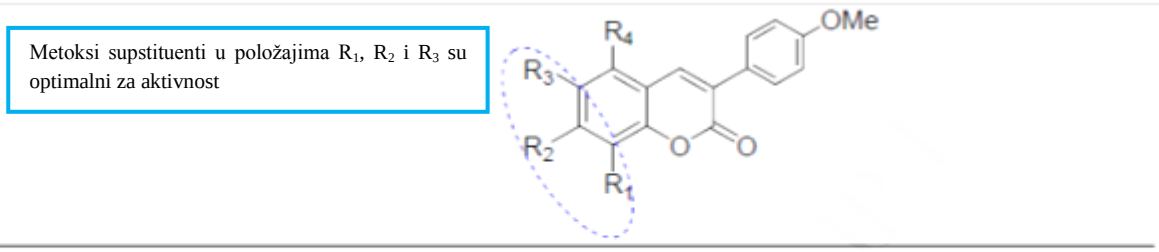


Spoj	R_1	R_2	$IC_{50}(\mu M)$			
			SGC-7901	MGC-803	Bcap-37	HEPG-2
18	4-CF_3	butan	2.91 ±0.11	2.35±0.27	3.55 ± 1.00	8.68 ± 1.17

Slika 9. SAR analiza derivata 1-(-3-supstituirani-5-fenil-4,5-dihidropirazol-1-il)-2-tio-etanona

6) Antimitotički agensi – mitoza je stanični proces, koji se javlja u zdravim i tumorskim stanicama, gdje dolazi do stvaranja dvaju identičnih setova kromosoma iz jedne jezgre. Derivati kumarina inhibiraju diobu stanica djelujući direktno na mitotičke faze, prometafazu i metafazu preko mikrotubula.[23]

U tu svrhu proučeni su polusintetski polialkoksi-3(4-metoksifenil)kumarini. Spoj **19** pokazuje evidentnu antimitotičku aktivnost zbog prisutnosti metoksi supstituenta u položaju C-5, C-6 i C-7. Također, spoj **19** je bio testiran i na 60 staničnih tumorskih linija porijeklom iz čovjeka gdje je uočeno da značajno inhibira rast svi testiranih tumorskih stanica (Slika 10.).[24]



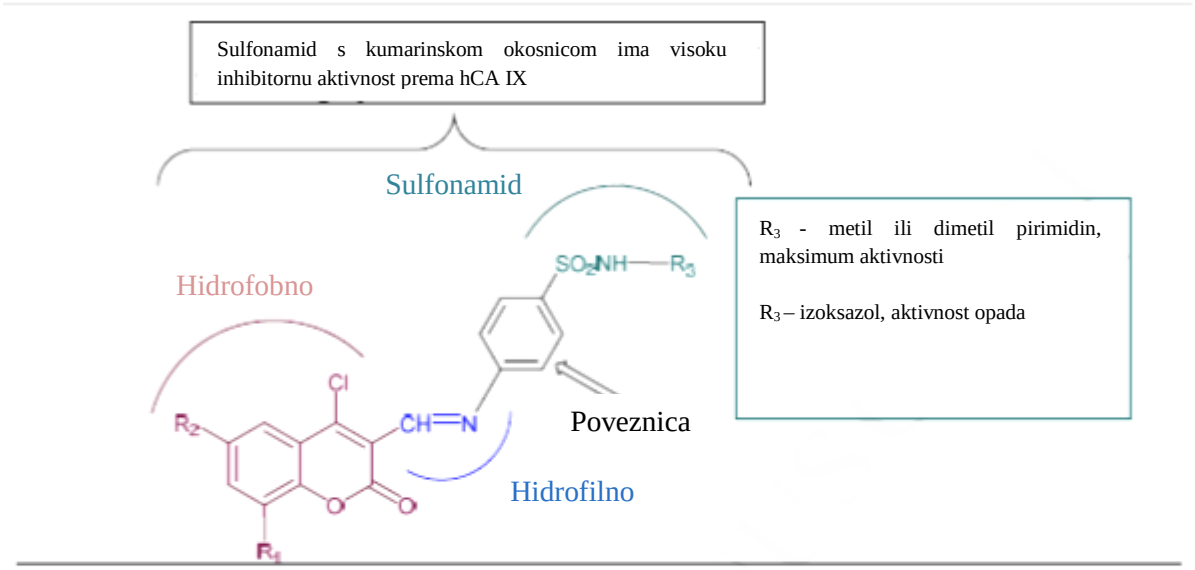
Spoj	R1	R2	R3	R4	$EC/\mu M^n$		
					Promjene u diobi stanica	Zaustavljanje diobe stanica	Embrio spining
19	OMe	OMe	OMe	H	0.2	4	>5

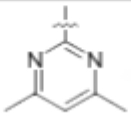
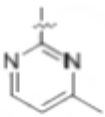
Slika 10. SAR analiza polialkoksi-3(4-metoksifenil) derivata kumarina

7) Inhibitori karboanhidraze – karboanhidraza, kontrolirana hipoksivnim-inducibilnim faktorom (HIF), djeluje na smanjenje količne kisika u širokom spektru tumorskih stanica.

Karboanhidraza je enzim koji katalizira pretvorbu ugljikovg dioksida do bikarbonata doprinoseći time zakiseljavanju tumorske okoline i stjecanju metastatskih fenotipova i kemijske otpornosti prema mnogim antitumorskim lijekovima.[25]

Dokazano je da kumarini kontroliraju pH tumorskih stanica i inhibiraju aktivnost karboanhidraze u svrhu kontroliranja hipoksivnih tumora. Shodno tome, sintetizirani su spojevi sa sulfonamidnim supstituentom na kumarinskoj okosnici. Aktivnost sintetiziranih spojeva je bila ispitana na izoenzimu karboanhidraze II (hCA II) i na izoenzimu karboanhidraze IX (hCA IX) porijeklom iz čovjeka. SAR analiza je potvrdila da sulfonamid zajedno s kumarinskom jezgrom povećava inhibiciju karboanhidraze s visokom efikasnošću. Spojevi **20** i **21** koji imaju u položaju R_3 pirimidinski prsten pokazuju maksimum aktivnosti, dok se uvođenjem izoksazola ta aktivnost smanjuje (Slika 11.).[26]



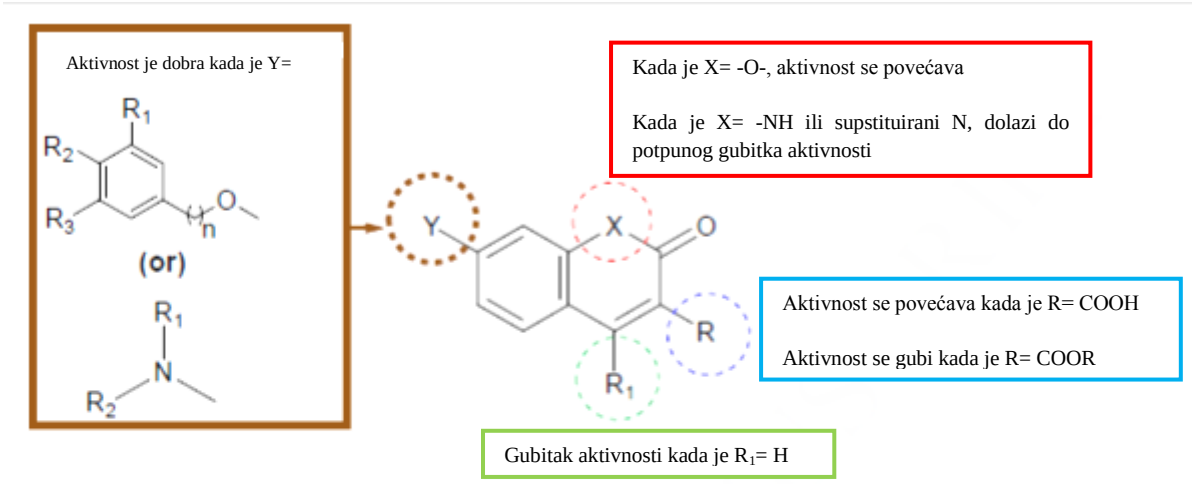
Spoj	R_1	R_2	R_3	$IC_{50}(\mu M)^a$ B16-F10[b]	MCF-7[b]	hCAs II[d]	hCA IX[d]
20	H	H		0.17	0.020	0.023	0.124
21	$CH(CH_3)_2$	$CH(CH_3)_2$		0.19	0.032	0.063	0.024

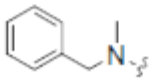
Slika 11. SAR analiza sulfonamida s kumarinskom okosnicom

8) Inhibitori monokarboksilatnih transportera (MCT) - u uvjetima hipoksije, tumorske stanice troše glukozu i otpuštaju laktat. Povišene količine otpuštenog laktata koriste ponovo oksidirane tumorske stanice kao svoje gorivo za sudjelovanje u ciklusu limunske kiseline

(TCA) i za unaprijeđivanje rasta tumora. MCT su glavni transporteri za laktat u ljudskom organizmu, a MCT1 kao i MCT4 su značajno izraženi u tumorskim stanicama. Inhibicijom MCT-a pomoću kumarina, koji blokiraju unos laktata, sprječavamo mogućnost upotrebe laktata od strane oksidiranih tumorskih stanica čime ih se prisiljava da ovise o glukozi. S druge strane, hipoksične tumorske stanice, koje inače ovise o glukozi, uslijed navedene inhibicije nemaju pristup dovoljnim količinama glukoze zbog čega nastupa smrt tumorskih stanica.[27]

Provedena su ispitivanja na sintetiziranim karboksikumarinima. Slijedeći detaljnu SAR analizu uočava se da je karboksilna kiselina nužna za inhibitornu aktivnost MCT-a jer zamjenom s esterskom skupinom sintetizirani spoj gubi svoju kompletnu aktivnost. *O*-benzil i sekundarni amin na položaju C-7 karboksikumarina poboljšava aktivnost spoja. Kisik na karboksikumarinu i položaj C-4 bez supstituenta su neophodni za blokiranje unosa laktata. Spoj **22** je najučinkovitiji inhibitor unosa laktata u ljudski organizam bez ikakvih antikoagulacijskih nuspojava. Ovaj spoj je također zanimljiv zbog svoje topljivosti u vodi što je glavni problem s većinom drugih kumarinskih analoga (Slika 12.).[28]



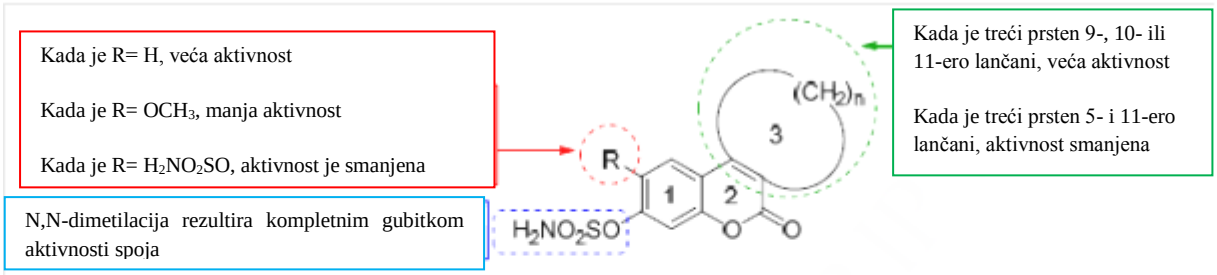
Spoj	Y	X	R	R_1	Citotoksičnost $EC_{50}(\mu M)$	Inhibicija unosa laktata $IC_{50}(\mu M)$
22		-O-	COOH	H	0.22	0.059

Slika 12. SAR analiza karboksikumarina

9) Inhibitori aromataze/sulfataze – derivati kumarina imaju sposobnost inhibicije nekoliko specifičnih tumorskih enzima kao što su aromataze i sulfataze. Steroidna sulfataza (STS) je odgovorna za konverziju estron-sulfata u aktivne hormone koji su odgovorni za rak dojke,

endometrija i prostate. Kumarini također inhibiraju i aromataze kako bi spriječili konverziju drugih hormona, na primjer androgena u estrogen. Na taj način, inhibicijom aromataza onemogućavamo stvaranje genotoksičnih metabolita estrogena.[29]

SAR studija je provedena na derivatu kumarina poznatom i kao Irosustats. Najdjelotvorniji analozi su oni u kojem je treći prsten 9-,10- i 11-ero člani. Prenošenjem sulfamatne skupine s položaja C-7 na položaj C-6 se smanjuje aktivnost spoja. Uvođenje metoksi supstituenta u položaj C-6 pridonosi manjoj aktivnosti spoja (Slika 13.).[30]



Spoj	R	n	PM IC_{50}(nM)[(a)]	JEG-3 IC_{50}(nM)
23	H	7	2.4	0.022
24	H	8	1	0.025
25	H	9	13	0.015

Slika 13. SAR analiza inhibitora steroida sulfataze (Irosustats)

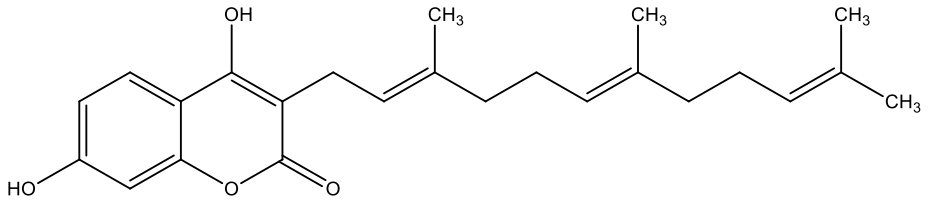
2.2. 7-HIDROKSI DERIVATI KUMARINA

Svakodnevno se u našem tijelu oslobađaju različiti oblici slobodnih radikala kisika (ROS – Reactive Oxygen Species) uslijed specifičnih metaboličkih procesa i bivaju uhvaćeni zahvaljujući učinkovitom ljudskom antioksidativnom mehanizmu. Problem se javlja ukoliko količina oslobođenih ROS-a premaši sposobnost antioksidativnog mehanizma čovjeka. Posljedica neučinkovitog antioksidativnog mehanizma su lančane reakcije oslobađanja ROS-a koji oštećuju stanice organizma oksidirajući njihove strukture i dovodeći do pojave raznih bolesti, među kojima i do razvoja tumora. Eksperimentalni podatci potvrđuju da tumorske stanice pokazuju povišene količine ROS-a i da imaju dokazano važnu ulogu u inicijaciji staničnog umnažanja, metastaziranja, angiogeneze, genetske modifikacije i otpornosti na apoptozu tumorskih stanica.

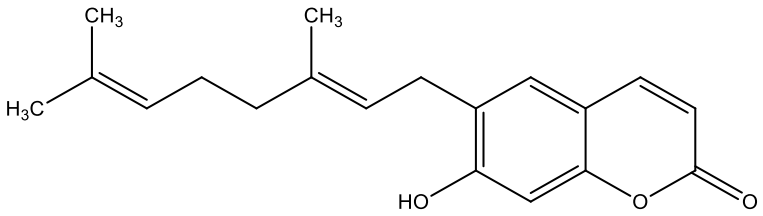
Zahvaljujući svojem antioksidativnom djelovanju, kumarini i njihovi 7-hidroksi derivati predstavljaju odnedavno jednu od vodećih klasa spojeva u ovom području. Brojni 7-hidroksi derivati kumarina imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala kisika (vodikov peroksid H_2O_2), superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), hidroksilni ($OH^{\cdot-}$) radikali) i na taj način uklanjanja iz ljudskog organizma.[31]

Osim antioksidativnih svojstava, 7-hidroksikumarini posjeduju i brojna druga biološka svojstva kao što su: antihipertenzivna, protuupalna, antitumorska, antibakterijska i antifungalna svojstva, a djeluju i kao biološki inhibitori, kemoterapeutici, antituberkulostatici i bioanalitički reagensi.

Nesupstituirani kumarin pokazuje vrlo nisku antibakterijsku aktivnost, međutim 7-hidroksi derivati kumarina s dugim ugljikovodičnim lancem kao supstituentom pokazuju izraženu antibakterijsku aktivnost za veliki broj ispitivanih bakterija. Primjer su amoresinol (**26**) i ostrutin (**27**) koji imaju negativan učinak za Gram-pozitivne bakterije *Bacillus megaterium, Micrococcus luteus, Micrococcus lysodeikticus* i *Staphylococcus aureus.*[32]

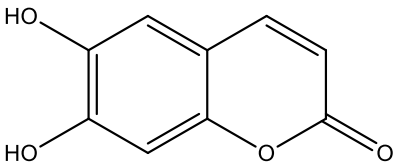


26



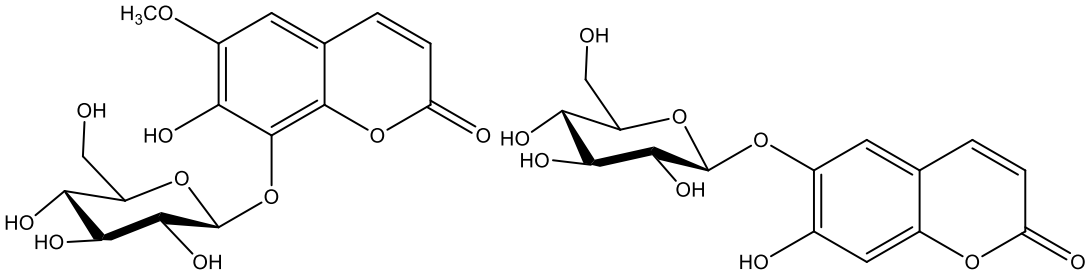
27

Eskuletin (**28**), izoliran iz *Cichorium intybus* i *Bougainvillea spectabilis*, pokazuje protuupalnu aktivnost kroz sposobnost inhibicije enzima ciklooksigenaze i lipooksigenaze koji su odgovorni za upalne simptome. Također, eskuletin pokazuje i antitumorsku aktivnost te suzbija toksičnost *N*-metil-D-aspartata u primarnim neuronima.[33]



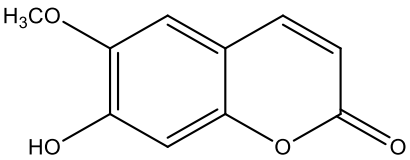
28

Fraksin (**29**) pokazuje sposobnost „hvatanja“ slobodnih radikala pri vrlo visokim koncentracijama (0,5 mM) i štiti stanice od oskidativnog stresa. Eskuletin (**28**) također pokazuje antioksidativna svojstva. Fraksin i eskulin (**29**) su pronađeni u stablu i plodovima kivija, *Actinidia deliciosa* i *Actinidia chinensis.* Eskulin je glikozidni kumarin sa vaskularnim terapeutskim svojstvima.[12]



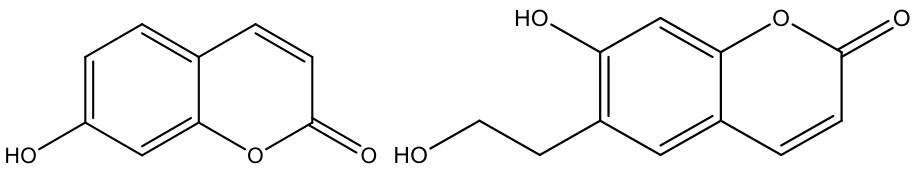
29 **30**

Skopoletin (**31**) je izoliran iz plodova *Tetrapleura tetraptera*, a posjeduje antihipertenzivna svojstva. Uočeno je kako skopoletin izaziva hipotenziju relaksirajući glatke mišiće kod ispitivanih laboratorijskih životinja u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Skopoletin ima značajna antibakterijska svojstva, regulira hormon serotonin i smanjuje depresiju i anksioznost.[34]



31

Umbeliferon (**32**) je pronađen u brojnim biljkama, a dobiven je destilacijom smola koje pripadaju biljkama razreda Umbelliferae. Umbeliferon, felodenol A (**33**) i skopoletin pokazuju antituberkuloznu aktivnost djelujući protiv bakterije *Mycobacterium tuberculosis.*[35]

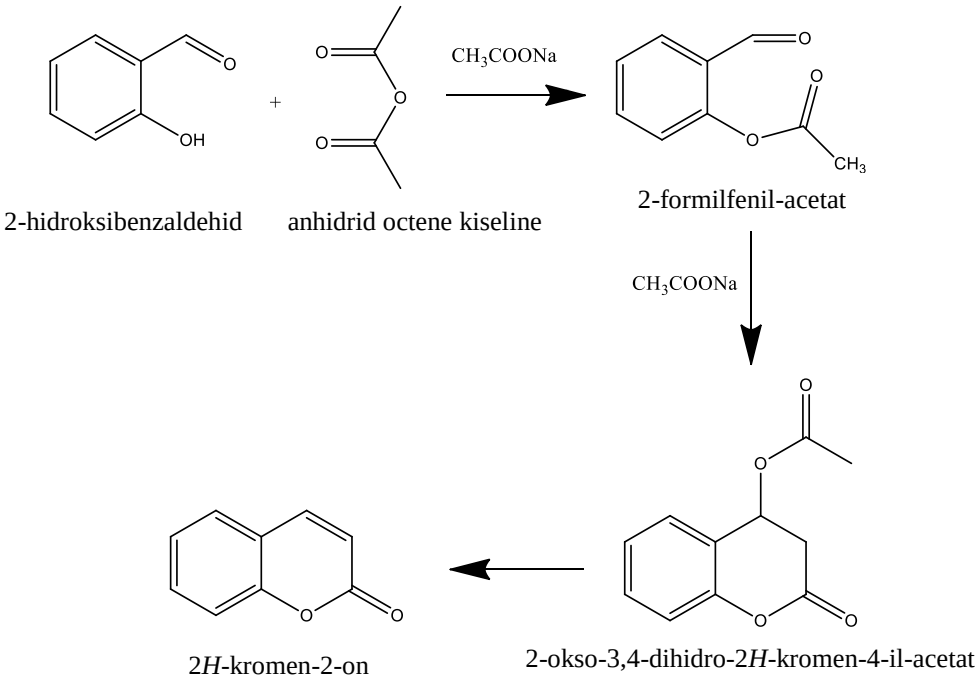


32 **33**

2.3. SINTEZA KUMARINA

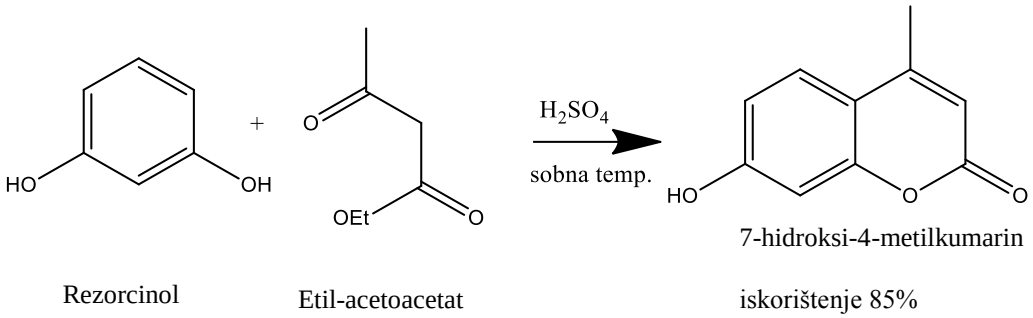
Unatoč velikoj dostupnosti kumarina i njihovih derivata iz prirodnih izvora, takav način njihovog dobivanja je nepouzdan zbog promjenjivih uvjeta okoline i naglih klimatoloških promjena. Kako bi se prevladali navedeni nedostatci, razvijeni su brojni pristupi laboratorijske sinteze kumarina. Jedna od glavnih strategija sinteze kumarina se temelji na reakcijama kondenzacije-ciklizacije te dobro poznatim Perkin-ovim, Pechmann-ovim i Knoevenagel-ovim reakcijama.

Perkinova sinteza je reakcija aldolne kondenzacije aromatskog aldehida i anhidrida octene kiseline uz prisutnost natrijevog acetata kao bazičnog katalizatora. U reakciji nastaje intermedijer, hidroksicimetna kiselina koja spontano prelazi u lakton odnosno kumarin (Shema 1.).[36]



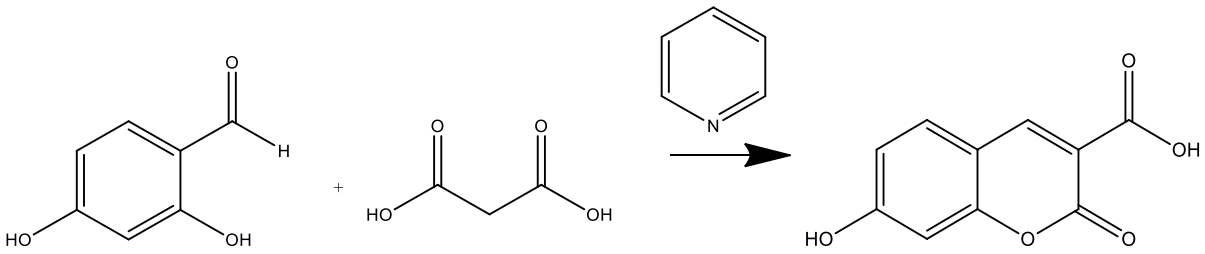
Shema 1. Perkinova sinteza kumarina

Iduća je Pechmannova sinteza koja predstavlja reakciju kondenzacije fenola s β-keto esterima u prisustvu sumporne kiseline. Mehanizam uključuje esterifikaciju, elektrofilni napad β-karbonilne skupine etil-acetoacetata na aromatski prsten i eliminaciju vode uz stvaranje novog prstena (Shema 2.).[37]



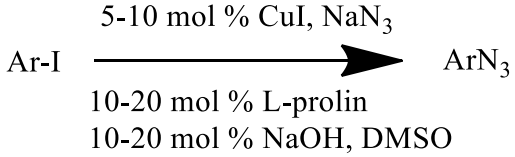
Shema 2. Pechmannova sinteza kumarina

Knoevenageleova sinteza se zasniva na reakciji aldehida ili ketona s dietil-malonatom, etil-acetotacetatom ili malonskom kiselinom uz prisutnost aminske baze, piridina ili piperidina. Mehanizam Knoevenageleove reakcije se sastoji od nukleofilne adicije karbaniona sa estera na karbonilnu skupinu aldehida uz prisutnost bazičnog katalizatora pri čemu nastaje C-C veza, zatvara se prsten i eliminira voda (Shema 3.).[38,39]



Shema 3. Knoevenagleova sinteza kumarina

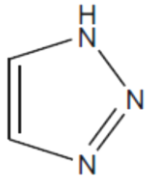
"One-pot" reakcija sinteze kumarinskog azida:



"One-pot" reakcije se temelje na sintezi produkata u jednom koraku bez izolacije nastalog međuprodukta. To se postiže dodatkom svih potrebnih reaktanata odjednom. Prednosti "one-pot" reakcija su: kraće vrijeme potrebno za sintezu, nema pročišćavanja međuprodukta i veća iskorištenja. Zbog navednih prednosti "one-pot" reakcije imaju čestu primjenu u organskoj sintezi, u ovom slučaju specifično, u sintezi aril-azida.

Metode sinteze aril-azida se uglavnom temelje na zamjeni diazonijeve soli ili nekog aktivnog aril-halida s natrijevim azidom. Izravnim povezivanjem inaktivnog aril-halida i natrijevog azida s CuI kao katalizatorom, dobivamo produkt u vrlo niskom iskorištenju, ponajviše zbog potrebnih viših temperatura kako bi navedeni reaktanti izreagirali, a to pak uzrokuje raspad nastalog aril-azida. U skladu s navedenim, nedavna istraživanja su pokazala kako amino kiseline kao aditivi mogu poboljšati Ullmann-ov tip vezivanja reaktanata snižavajući temperaturu reakcije. Jedna od takvih amino kiselina je i L-prolin koji u reakciji aril-halida s natrijevim azidom i katalizatorom CuI daje stabilan aril-azid.[40]

2.4. 1,2,3-TRIAZOL KAO FARMAKOFOR



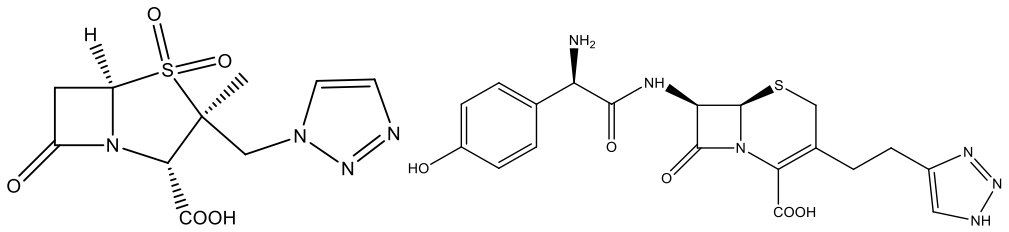
Slika 14. 1,2,3-triazol

1,2,3-triazol (Slika 14.) je heterociklički amin koji ima vrlo važnu ulogu u organskoj i medicinskoj kemiji zbog jednostavne sinteze "klik" kemijom i brojnih bioloških aktivnosti. Važnost triazolnog prstena u strukturi lijekova leži u njegovoj inertnosti na različite hidrolitičke, oksido/redukcijske uvjete i metaboličku razgradnju pokazujući veliku aromatsku stabilnost. Također, ovi heterociklički amini imaju izrazito rigidnu strukturu, visoki dipolni moment (5D) te mogu stvarati vodikove veze s ciljanim biomolekulama. 1,2,3-triazoli su ključna strukturna okosnica brojnih bioaktivnih molekula koje pokazuju antifungalna, antibakterijska, antialergijska, anti-HIV, antituberkulozna i protuupalna svojstva. Tazobaktam, cefatrizin i karboksiamidotriazol su danas dostupni antitumorski lijekovi koji sadrže 1,2,3-triazolni prsten u svojoj strukturi (Slika 15.). Uloga 1,2,3-triazola kod biološki aktivnih molekula je različita, djeluju kao:

a) disupstituirani bioizosteri (obično u 1,4-položaju)

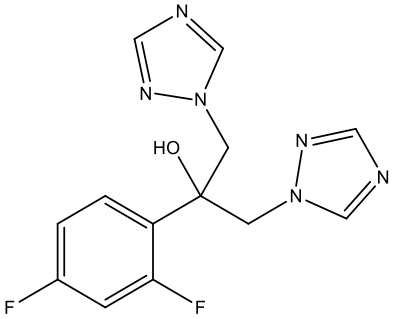
b) poveznica između dviju biološki aktivnih molekula

c) ugrađuju se u policikličku okosnicu biološki aktivne molekule.[41]

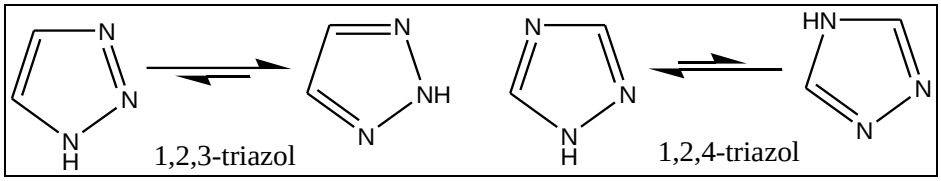


Slika 15. Potencijalni farmaceutici koji sadrže 1,2,3-triazol

Jedna od izraženijih bioloških aktivnosti triazola je antifungalna aktivnost. Mehanizam inhibicije rasta gljivica od strane triazola se sastoji od dva koraka: inhibicija sinteze ergosterola, glavne komponente membrane gljivica, i blokiranje enzima CYP 51 koji pripada P450 skupini enzima. Jedan od najčešće korištenih lijekova za gljivične infekcije je Flukonazol prikazan na slici 16. Možemo uočiti da se ovdje radi o 1,2,4-triazolu što je drugi izomerni oblik triazolnog prstena pored prethodno navedenog 1,2,3-triazola (Slika 17.).[42]



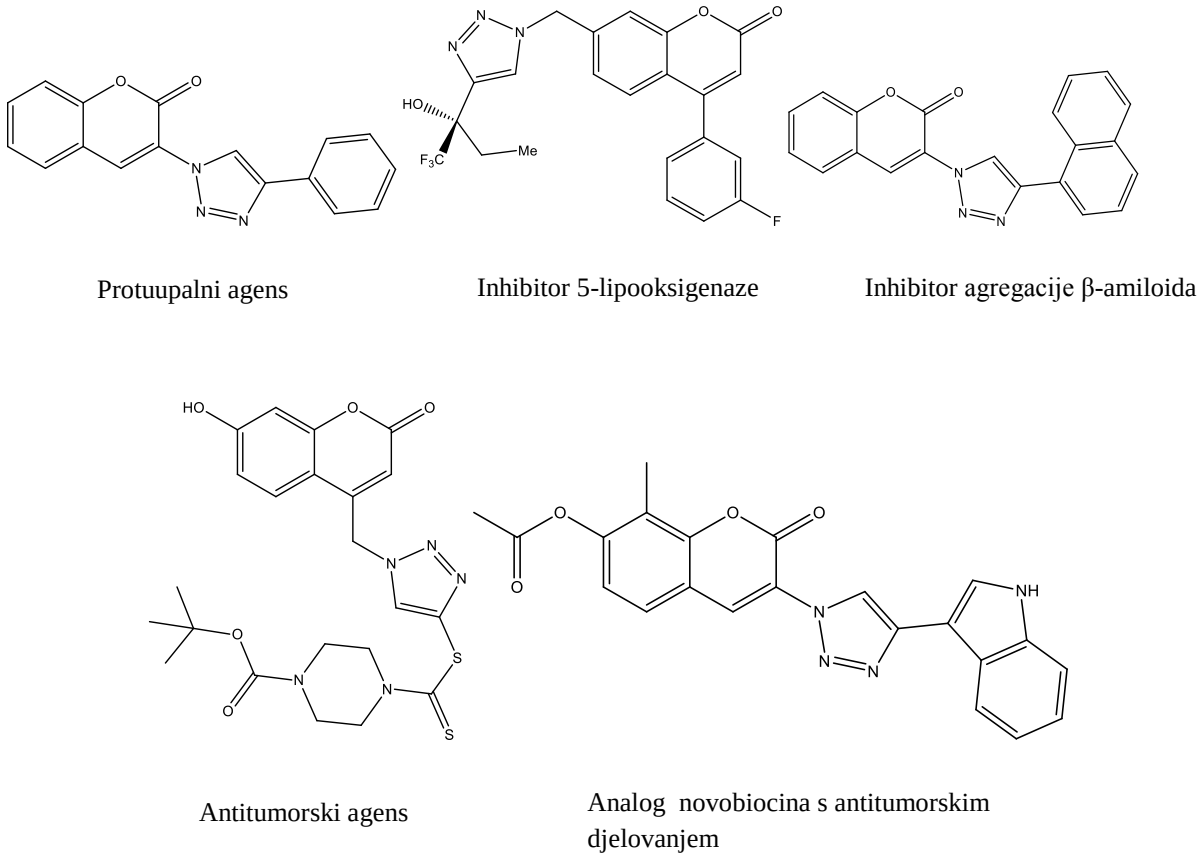
Slika 16. Flukonazol



Slika 17. Izomerni oblici 1,2,3- i 1,2,4-triazola

U posljednjih nekoliko godina sintetiziran je veliki broj biološki aktivnih derivata kumarina konjugiranih s 1,2,3-triazolnim prstenom. Ubrzo nakon što je otkrivena njihova antitumorska aktivnost, H.M.Liu i suradnici su otkrili da derivati 4-((1,2,3-triazol-1-il)metil)kumarina pokazuju antitumorsku aktivnost inducirajući apoptozu tumorskih stanica. Osim toga,

novobiocin s 1,2,3-triazolnim prstenom na C-3 položaju kumarina pokazuje potencijalnu citotoksičnu aktivnost za dvije stanične linije raka dojke (SKBr-3 i MCF-7). Nadalje, derivati 3-(1,2,3-triazol-1-il)kumarina pokazuju protuupalnu aktivnost tako što reduciraju neutrofile u upaljenom potkožnom tkivu, dok triazol na C-7 položaju kumarina inhibira enzim 5-lipooksigenazu i na taj način pokazuje protuupalnu aktivnost. Naposlijetku, spojevi s 1,2,3-triazol-1-ilnim supstituentom na C-3 položaju kumarina inhibiraju nakupljanje beta-amiloida koji imaju glavnu patogenu ulogu u progresiji Alzheimerove bolesti (Slika 18.).[43]



Slika 18. Strukture derivata kumarina konjugiranih s 1,2,3-triazolnim prstenom

Derivati kumarina kojima je triazolni prsten bio zamijenjen s piperazinom pokazali su u potpunosti gubitak svoje biološke aktivnosti. Time možemo potvrditi važnost triazolnog prstena u dizajniranju antitumorskih i antivirusnih lijekova zbog specifičnog konjugacijskog efekta triazola i aromatskog sustava koji ima presudnu ulogu u biološkoj aktivnosti spojeva (Slika 19.).[43]



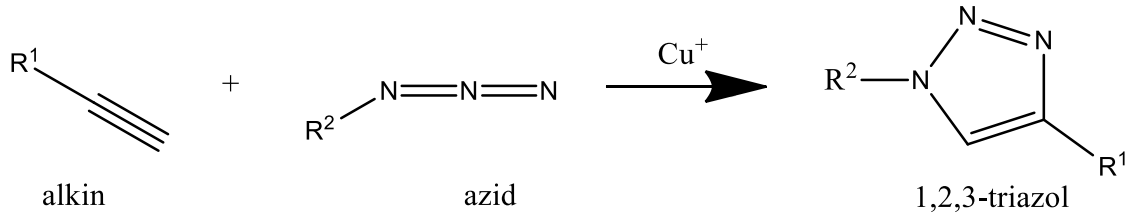
Slika 19. SAR analiza derivata kumarina kojima je triazolni prsten zamijenjen piperazinom

2.5. "KLIK" KEMIJA

Pojam "klik" kemija uveli su 2001. godine Sharpless, Kolb i Finn, a podrazumijeva kemijske reakcije u kojima nastaju veze ugljikovih atoma s heteroatomima i u kojima se brzo i pouzdano dolazi do produkata spajanjem više manjih jedinica. Sharpless i suradnici su definirali niz uvjeta koje reakcija treba zadovoljiti da bi se smatrala "klik" reakcijom, a to su: široki raspon primjene, bezopasni i lako uklonjivi nusprodukti, stereospecifičnost, jednostavni reakcijski uvjeti, neosjetljivost na vodu i kisik, uporaba lako dostupnih reagenasa, neškodljiva otapala te nastanak stabilnog produkta u velikom iskorištenju uz jednostavnu izolaciju. Za nekoliko vrsta reakcija je otkriveno da zadovoljavaju uvjete „klik" kemije: termodinamički favorizirane reakcije koje vode do jednog produkta, kao što je reakcija nukleofilnog otvaranja prstena između epoksida i aziridina; nealdolni tipovi karbonilnih reakcija, kao što je nastajanje hidrazona i heterocikla; adicije na C-C višestruke veze, kao što je oksidativno nastajanje epoksida, Michaelove adicije i Huisgenova 1,3-cikloadicija.[44]

Huigsenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida i alkina je najzastupljenija i najpoznatija "klik" reakcija (Shema 4.). Već u prvim reakcijama cikloadicije s olefinima i alkinima uviđen je potencijal organskih azida kao visoko energetskih i vrlo selektivnih funkcionalnih skupina zbog čega predstavljaju neizostavan segment "klik" kemije. Međutim, vrlo spori tijek azid-alkin cikloadicije nije učinio ove reakcije korisnima sve do otkrića katalizatora, bakra(I). Meldal i Sharpless 2001. godine u reakciju 1,3-dipolarne cikloadicije azida i terminalnih alkina uvode bakar(I) kao katalizator. Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija prevodi azid i terminalni alkin u odgovarajući 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol za razliku od nekatalizirane "klik" reakcije koja zahtijeva znatno veće temperature i rezultira nastajanjem smjese 1,4- i 1,5-triazolnih regioizomera. Također, reakcija je mnogo brža (10^7 puta) od

nekatalizirane Huisgenove cikloadicije, a odvija se pri temperaturama od 0 do 25 °C. Sterička i elektronska svojstva supstituenata koji se nalaze na azidu i alkinu ne utječu bitno na tijek katalizirane "klik" reakcije. Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija azida i alkina ima široku primjenu u sintetskoj organskoj kemiji, medicinskoj kemiji i kemiji materijala.[45]



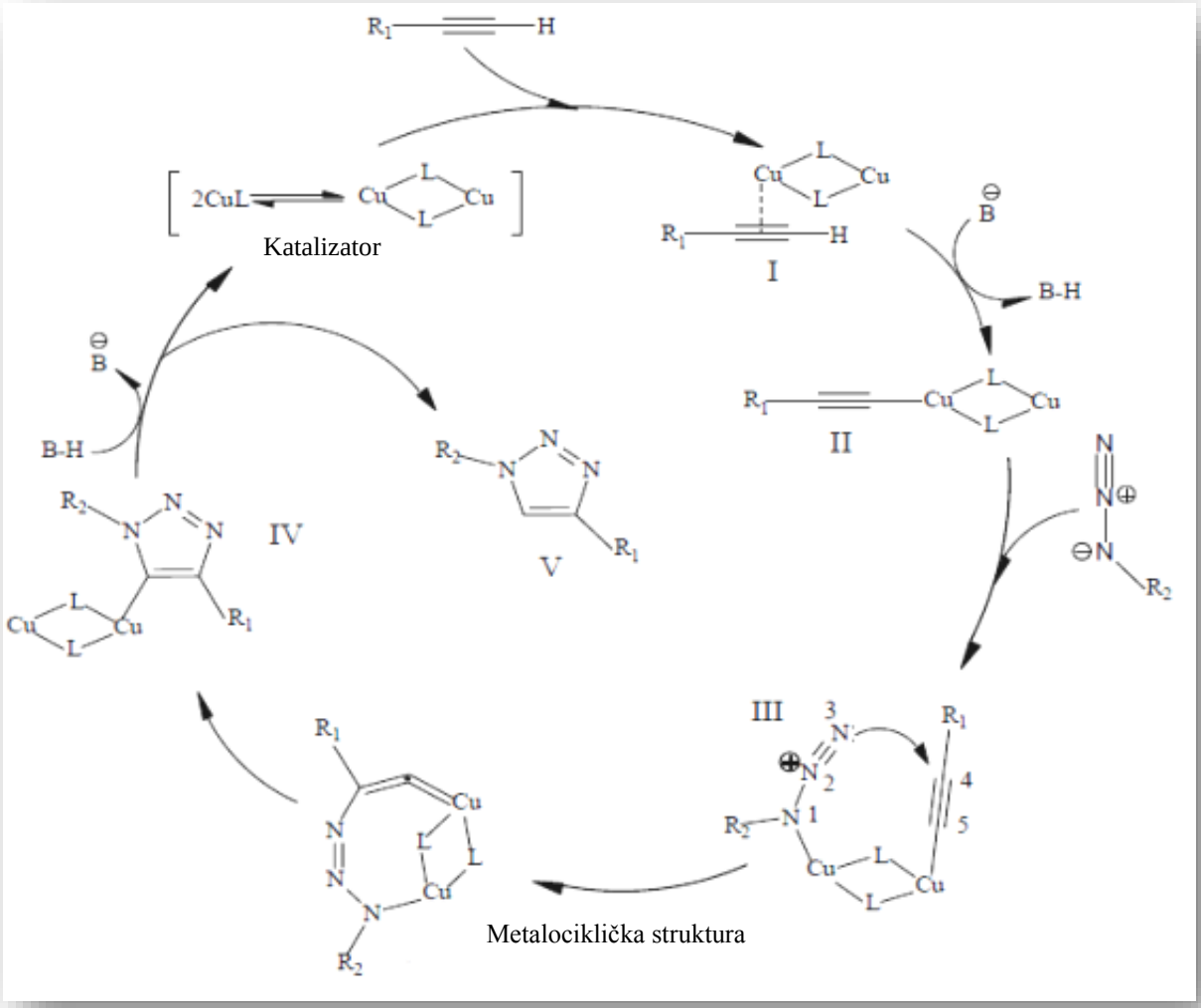
alkin azid 1,2,3-triazol

Shema 4. Bakrom katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

Najčešći izvor bakra(I) kao katalizatora je sustav Cu(II)/Na-askorbat gdje natrijev askorbat djeluje kao blago redukcijsko sredstvo koje reducira stabilne Cu(II) soli kao što su $CuSO_4x5H_2O$ do Cu(I) oksidacijskog stanja. Ovom metodom se dobivaju visoke koncentracije Cu(I) za vrijeme čitave reakcije što je vrlo bitno za njenu krajnju učinkovitost. Također, prisutnost askorbata sprječava stvaranje oksidativnih produkata koji nastaju ukoliko se reakcija provodi u organskim otapalima gdje može doći do redukcije Cu(I) u Cu(0). Bakrove soli (CuI i CuBr) su drugi najčešći izvor Cu(I). Međutim, bakrove soli imaju znatno manju aktivnost za stvaranje intermedijara, Cu-acetilida u usporedbi sa sustavom Cu(II)/askorbat.

Mehanizam CuAAC (*eng. Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) započinje reakcijom Cu(I) s trostrukom vezom terminalnih alkina pri čemu nastaje π kompleks, bakrov(I) acetilid koji snižava p*K*a te na taj način olakšava uklanjanje terminalnog kiselog vodika s alkina i nastajanje spomenutog međuprodukta. Nastali međuprodukt, bakrov(I) acetilid podliježe nukleofilnom napadu terminalnog N(3) azida na atom C(4) alkina što dovodi do stvaranja šesteročlane metalocikličke strukture. Pregradnjom šesteročlane metalocikličke strukture nastaje bakrov triazolid. Nakon protoniranja, Cu(I)-ligand kompleks disocira s triazolida i daje konačni produkt, 1,4-disuptituiranog triazol s 91%-tnim iskorištenjem, a oslobođeni katalizator-ligand kompleks se može ponovo upotrijebiti za iduću reakciju (Shema 5.).[46]

Prema svemu navedenom lako je zaključiti da se CuAAC reakcije, kojima nastaje 1,2,3-triazol kao farmakofor, zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti koriste u različitim aspektima otkrivanja antitumorskih i drugih lijekova.

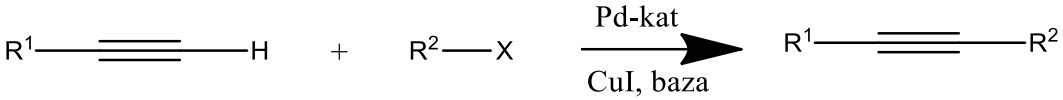


Shema 5. Mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom

2.6. SONOGASHIRA-INA REAKCIJA

Sonogashira-ina reakcija unakrsnog povezivanja je paladijem katalizirana reakcija u kojoj nastaje nova C-C veza uslijed povezivanja terminalnog sp hibridiziranog ugljika alkina i sp^2 hibridiziranog ugljika arilnog ili vinilnog halogenida (Shema 6.). Osim paladija kao katalizatora, nužni preduvjeti Sonogashira-ine reakcije su i amino baza te bakrov halogenid kao kokatalizator. Porijeklo imena ove reakcije seže u 1975.god kada su japanski kemičari K. Sonogashira, N. Hagihara i Y. Tohda prvi proveli paladijem kataliziranu reakciju pri sobnoj

temperaturi uz dobivena visoka iskorištenja sintetiziranih spojeva. Sonogashira-ina reakcija smatra se jednom od najznačajnijih reakcija moderne organske sinteze, a njeni produkti imaju različitu primjenu kod sinteze bojila, senzora, elektroničkih materijala, polimera, farmaceutika, prirodnih i biološki važnih spojeva, a predstavljaju i važne sintetske intermedijare.[47]



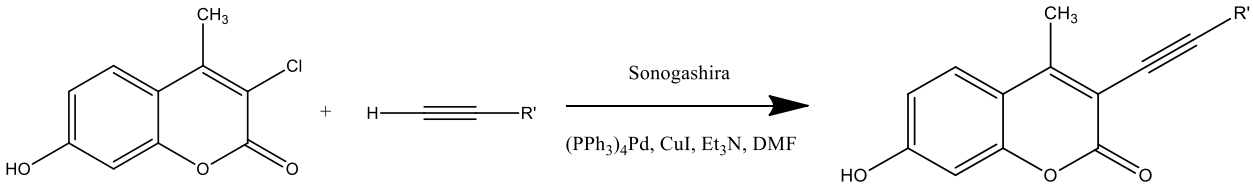
R^1=aril, heteroaril, alkil

R^2=aril, heteroaril, vinil

X=I, Br, Cl, OTf

Shema 6. Općeniti prikaz Sonogashira-ine reakcije

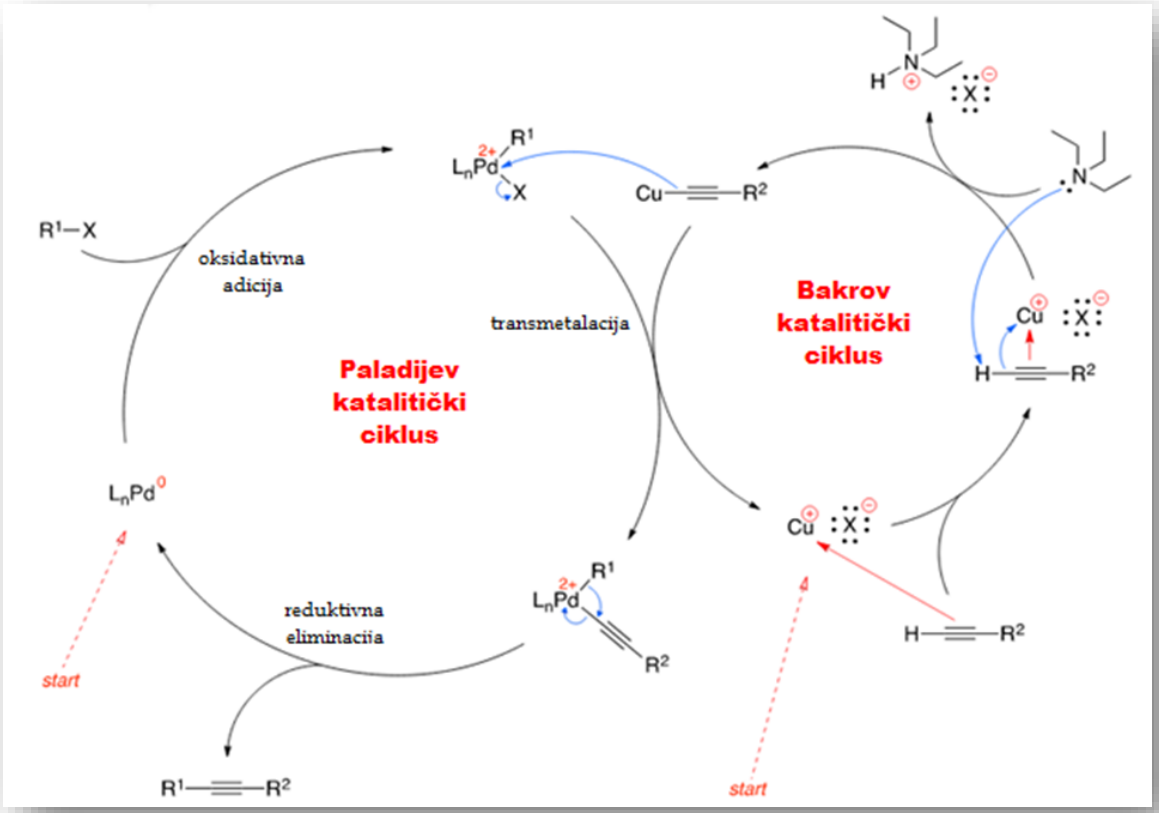
Razvojem sinteze antitumorskih lijekova iz reda kumarinskih analoga, pokazano je da su derivati kumarina, koji imaju vezan atom klora na C-3 atomu, dobri sintetski intermedijari za stvaranje nove C-C veze. Zbog toga su Sonogashira-inom reakcijom kumarina i terminalnih alkina uz $(PPh_3)_4Pd$ katalizator, CuI ko-katalizator i Et_3N u DMF-u pripravljeni derivati kumarina s alkilnim supstituentima u položaju 3 kumarinskog prstena (Shema 7.). Za uspješno povezivanje terminalnih alkina s 3-klorkumarinima izuzetno je važan i odabir otapala, kao i omjer katalizatora te kokatalizatora.



Shema 7. Sonogashira-ina reakcija 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina i terminalnih alkina

Predloženi mehanizam Sonogashira-ine reakcije sastoji se od: arilni halid ulazi u paladijev katalitički krug oksidativnom adicijom pri čemu nastaje organometalni spoj kao produkt vezanja arila i halogenog elementa zasebno za atom paladija. Istovremeno u bakrovom katalitičkom krugu dolazi do disocijacije bakrovog halogenida i nastajanja organometalnog spoja u kojem se bakar veže na alkin supstitucijom s terminalnim atomom vodika, koji se veže na višesupstituirani amin koji s halogenidom nastalim disocijacijom s bakrom, tvori kvaternu amonijevu sol. Ta dva organometalna spoja transmetaliranjem uzrokuju otpuštanje

halogena u arilnom, te bakra u alkinilnom spoju, uz regeneraciju bakrovog halogena u bakrovom katalitičkom krugu. U konačnom stupnju, reduktivnom eliminacijom nastaje produkt Sonogashira-ine reakcije stvaranjem veze između arila i alkina, uz regeneraciju paladijevog katalizatora u paladijevom katalitičkom krugu (Shema 8.).[48]



Shema 8. Mehanizam Sonogashira-ine reakcije

2.7. UV/VIS I FLUORESCENCIJSKA SPEKTROSKOPIJA

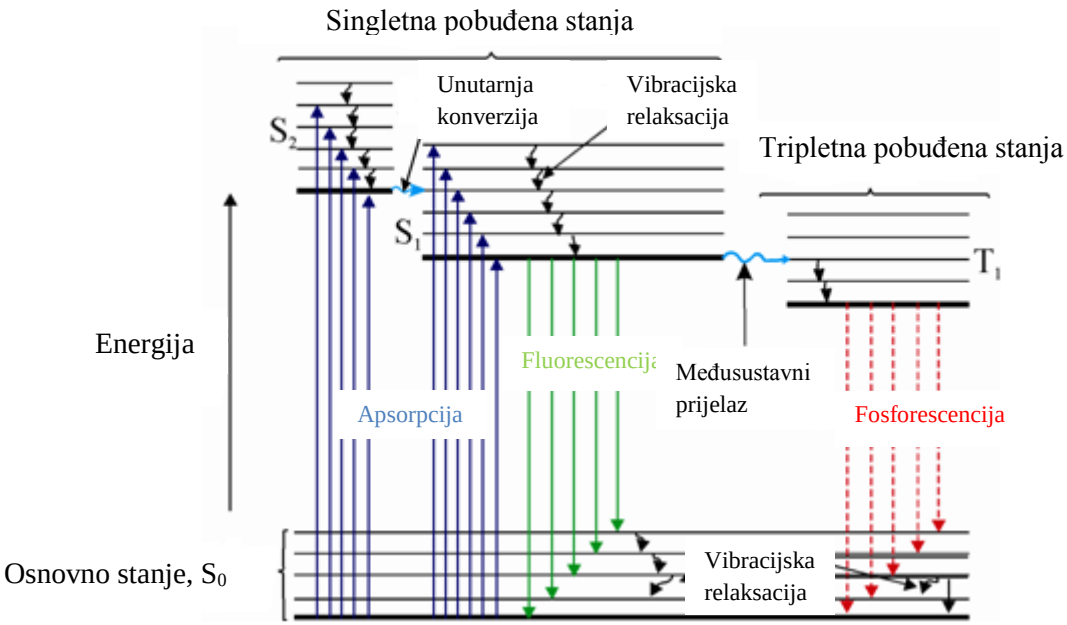
Organske molekule imaju sposobnost apsorbiranja UV (200-400 nm) odnosno vidljivog (400-800 nm) dijela elektromagnetskog zračenja ovisno o energiji fotona i o elektronskoj konfiguraciji molekule, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Apsorpcija UV/VIS zračenja uzrokuje prelazak elektrona iz popunjene orbitale niže energije (HOMO) u nepopunjenu orbitalu više energije (LUMO). Svjetlo se može apsorbirati samo ako se energija pobuđivanja podudara s energijom fotona, $\Delta E = h\nu$. Apsorpcijom fotona molekula prelazi u pobuđeno stanje, a energija fotona dio je ukupne energije molekule u pobuđenom stanju. S obzirom da svaka molekula ima različitu orbitalnu strukturu, različito će i apsorbirati svjetlo. Dio molekule odgovoran za apsorpciju svjetla zove se kromofor. Što

molekula učinkovitije apsorbira svjetlo na određenoj valnoj duljini, to je veća apsorpcija. Iz ovoga proizlazi Beer-Lambertov zakon koji kaže da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće vrste dok molarni apsorpcijski koeficijent ε govori o tome kolika je vjerojatnost apsorpcije na određenoj valnoj duljini.

$$A \equiv \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \, c \, l$$

gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini, c je molarna koncentracija otopine (mol/dm^3), l je duljina ćelije (cm), a ε je molarni apsorpcijski koeficijent (dm^3 mol^{-1} cm^{-1}).

Elektronska i vibracijska stanja molekula te prijelazi među njima (apsorpcija, vibracijska relaksacija, unutarsustavni prijelaz, unutarnja konverzija i emisija) prikazuju se dijagramom Jablonskog (Slika 20.).[49]



Slika 20. Jablonski dijagram

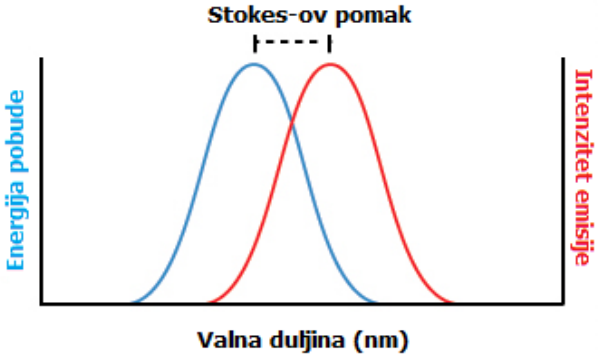
Iz snimljenog apsorpcijskog spektra odnosno spektra pobuđivanja organski fotokemičar može očitati na kojoj valnoj duljini ispitivana molekula najbolje apsorbira, a osim toga uz pomoć Beer-Lambertovog zakona može se analitički odrediti koncentracija otopine ispitivane molekule iz izmjerene apsorbancije.

Instrument koji se koristi u UV/VIS spektroskopiji zove se UV/VIS spektrofotometar. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla (I_0).

Osnovne apsorpcijske vrpce kumarina nalaze se u području od 290 do 350 nm te od 210 do 275 nm, a uvjetovane su kromoforima koji uključuju međusobnu povezanost pironskog i benzenskog prstena. Kod derivata kumarina supstituiranih u benzenskom prstenu, ovisno o položaju supstituenata dolazi u UV spektru do pomaka maksimuma apsorpcije. Hidroksilna skupina u položaju 5 ili 8 izaziva hipsokromni pomak (pomak prema manjim valnim duljinama – plavi pomak), dok ta ista skupina u položaju 6 ili 7 dovodi do batokromnog pomaka (pomak prema većim valnim duljinama – crveni pomak). Na osnovi promjene intenziteta apsorpcije u UV području razrađena je kvantitativna metoda za određivanje nekih derivata kumarina biljnog porijekla.[50]

Brojni su procesi kojima se pobuđena vrsta može vratiti iz pobuđenog stanja u osnovno. Radijativna deaktivacija pobuđenog stanja zove se fotoluminiscencija. Fluorescencija i fosforescencija su pojedinačni slučajevi luminiscencije, a razlikuju se po multiplicitetu pobuđenog stanja iz kojeg se pojedini proces odvija. Fluorescencija se odvija iz S_1 u S_0 elektronsko stanje koje je dozvoljeno zbog suprotnih spinova elektrona u osnovnom singletnom (S_0) i pobuđenom singletnom stanju (S_1) i istog multipliciteta elektronskih stanja singlet-singlet, dok se fosforescencija odvija iz T_1 u S_0 elektronsko stanje koje je zabranjeno zbog istih spinova elektrona u osnovnom singletnom (S_0) i pobuđenom tripletnom stanju (T_1) i promjene multipliciteta elektronskih stanja singlet-triplet.

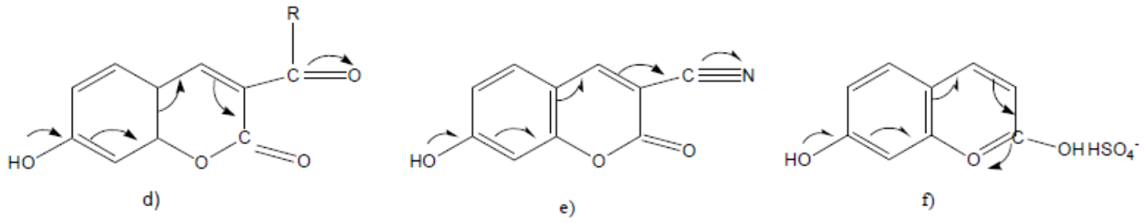
Fluorescencijski spektar ili spektar emisije se javlja na većim valnim duljinama od apsorpcijskog spektra ili spektra pobuđivanja zbog gubitka energije u pobuđenom stanju procesom vibracijske relaksacije. Ta razlika između maksimuma apsorpcijskog spektra i maksimuma fluorescencijskog spektra, izražena valnim brojem, zove se Stokes-ov pomak (Slika 21.).



Slika 21. Stokes-ov pomak

Budući da molekula emitira fotone iz S_1 elektronskog stanja u različite vibracijske razine S_0 elektronskog stanja, dobit ćemo spektar energija fluorescirajućih fotona. Spektar se mjeri spektrofluorimetrom, a na dobivenom grafu intenzitet fluorescencije izražava se kao funkcija valne duljine emitiranih fotona.[49]

Na intenzitet fluorescencije znatno utječe mjesto supstitucije kao i sam karakter supstituenta. Uvođenjem elektron akceptorskih skupina u položaj 3 kumarinskog prstena (karbonilna, cijano skupina) dolazi do premještanja elektrona u pironskom prstenu (Slika 22.). Posljedica toga je fluorescencija tvari i u neutralnim otopinama.



Slika 22. Premještanje elektrona u pironskom prstenu uvođenjem elektronakceptorske skupine u položaj 3 (d-karbonilna skupina u položaju 3; e-cijano skupina u položaju 3; f-7-hidroksikumarin u kiselom mediju)

Istovremeno, sve izmjene koje pomažu premještanje elektrona u pironskom prstenu dovode do pojačanja fluorescencije. U krutom stanju fluoresciraju uglavnom derivati 7-hidroksikumarina, dok fluorescencija kumarinskih derivata u vodenim otopinama obično ovisi o koncentraciji vodikovih iona.[51]

2.8. PREDVIĐANJE SPEKTRA AKTIVNOSTI SPOJEVA *IN SILICO* ANALIZOM (PASS)

Termin *in silico* je moderan izraz kojim se obično opisuju predviđanja i simulacije biološke aktivnosti spojeva koja provode računala na temelju velike baze podataka enzima i drugih meta lijekova koje posjeduju. Povijest samog naziva je slabo definirana, smatra se da je povezana sa silicijem, metalom koji je ključna sastavnica kompjuterskih čipova. Glavne prednosti ovakvog načina analize su: značajno skraćena eksperimentalna istraživanja u laboratoriju, veća ekonomičnost te su predviđanja vrlo brza, proračun spektra biološke

aktivnosti za 10 000 spojeva na običnom računalu traje 5 minuta. *In silico* farmakologija, poznata i kao računalna terapeutika, računalna farmakologija, je brzo rastuće područje na globalnoj razini koje unaprijeđuje razvoj tehnike radi korištenja softvera za snimanje, analizu i integraciju bioloških i medicinskih podataka iz mnogo različitih izvora. Točnije, *in silico* farmakologija definira način korištenja dobivenih informacija radi stvaranja računalnih modela i simulacija koja se mogu koristiti kako bi proveli predviđanja, predlagali hipoteze te u konačnici osigurali napredak ili otkriće u području lijekova i medicine.[52]

Akronim PASS (eng. Prediction of Activity Spectra for Substances) označava predviđanje spektara aktivnosti spojeva na temelju 2D strukturne formule tvari. PASS je standardni softverski paket koji posjeduje SAR (Structure-Activity Relationship) bazu podataka i može kvalitativno predvidjeti preko 4 300 različitih bioloških aktivnosti spojeva. Koncept spektra biološke aktivnosti je ključan za PASS analizu, a predstavlja intrinzično svojstvo spojeva koje ovisi samo o njihovoj strukturi. Međutim, biološka aktivnost, osim o strukturi spoja ovisi i o raspodjeli naboja, fizikalno-kemijskim svojstvima, o biološkoj vrsti i načinu liječenja. Kemijska struktura za PASS analizu je opisana pomoću MNA (eng. Multilevel Neighborhoods of Atoms). MNA deskriptori opisuju različite struktura-svojstva odnose, uključujući brojne tipove biološke aktivnosti, mutagenost, karcinogenost, vrelište itd. S obzirom na aktivnosti istraživanih spojeva postoje dvije mogućnosti: P_a – mogućnost aktivnosti spoja i P_i – mogućnost ne-aktivnosti spoja. Vrijednosti za obje mogućnosti, P_a i P_i variraju od 0,000 do 1,000 i obično je $P_a+P_i<1$. Trenutno dostupna verzija PASS programa sadrži 45 466 biološki aktivnih spojeva i 783 tipa biološke aktivnosti.[53]

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. OPĆE NAPOMENE

Sva korištena otapala sušena su i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å.

Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC), koja je provođena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silikagela Merck u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

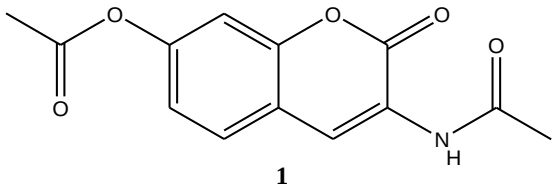
Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu *Fluka* (0,063-0,2 nm), a staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije te je kao eluens korištena smjesa diklormetan : metanol u odgovarajućem omjeru.

Spektri ^{1}H-NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 MHz. Svi su uzorci otopljeni u DMSO-d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici promjera 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^{1}H-NMR spektrima izraženi su u jedinicama ppm u odnosu na tetrametilsilan (TMS, δ=0,0 ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije asignirane su na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

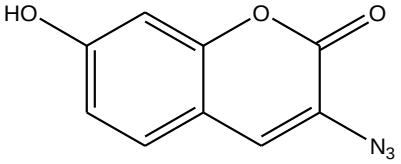
UV/Vis spektri snimljeni su na Varian Cary 50 spektrofotometru. Fluorescencijski emisijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 0,5 cm te volumena 3 cm^3.

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici u kvarcnim posudama.

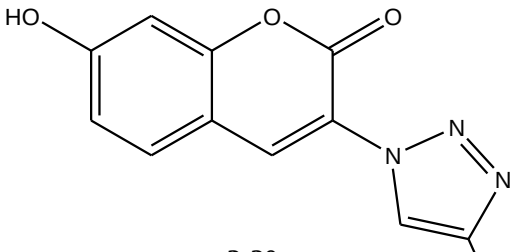
3.2. PREGLED SINTETIZIRANIH SPOJEVA



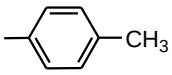
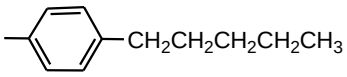
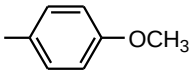
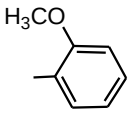
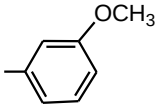
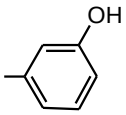
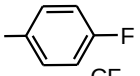
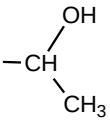
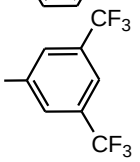
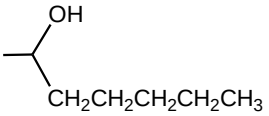
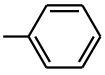
1

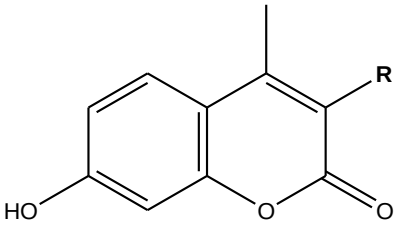


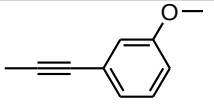
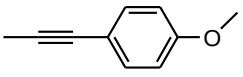
2



3-20

	R		R
3	$-CH_2CH_2CH_2CH_3$	**13**	
4	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**14**	
5	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**15**	
6	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**16**	
7	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**17**	
8	$-CH_2CH_2OH$	**18**	
9	$-CH_2CH_2CH_2OH$	**19**	
10		**20**	
11			
12			



R	
21	
22	

3.3. PRIPRAVA SPOJEVA

3.3.1. 3-acetamido-2-okso-2*H*-kromen-7-il acetat (1)

Reakcijska smjesa 2,4-dihidroksibenzaldehida (2,76 g; 20 mmol), *N*-acetilglicina (2,34 g; 20 mmol) i natrijevog acetata (4,292 g; 60 mmol) u anhidridu octene kiseline (100 mL) refluksirana je (140-150°C) tijekom 4 h. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Nakon završetka reakcije na dnu se istaloži talog. Reakcijska smjesa je zatim izlivena na led (300-400 mL), a nastali žuti talog odfiltriran preko Büchnerovog lijevka i ispran ledenom vodom. Nakon sušenja je dobiven žuti talog spoja **1** (839,8 mg; 16%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,76 (s, 1H), 8,62 (s, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 8,4, 2,2 Hz, 1H), 2,27 (d, *J* = 5,4 Hz, 3H), 2,17 (s, 3H).

3.3.2. 3-azido-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (2)

Spoj **1** je refluksiran u smjesi koncentrirane HCl i etanola (2:1, 30 mL) tijekom 1h (smjesa postane crvena kad se doda kiselina). Zatim je dodana ledena voda (40 mL), a smjesa zatim ohlađena u ledenoj kupelji te je dodan $NaNO_2$ (2,76 g; 40 mmol). Reakcijska smjesa je potom miješana 5-10 min i dodan je NaN_3 (3,9 g; 60 mmol) u obrocima. Nakon miješanja 15 min nastali talog je odfiltriran, ispran vodom i osušen pod sniženim tlakom pri čemu je izoliran smeđa krutina spoja **2** (258 mg; 6,5%).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,53 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,81 (dd, *J* = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 6,76 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H).

3.3.3. 3-(4-butil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (3)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te heksin (0,046 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=20/1). Izoliran je spoj **3** (48,3 mg; 33,9%; T_t= 108-110°C).

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 10,18 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,67 (dd, *J* = 21,9, 8,3 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J* = 8,4, 2,2 Hz, 1H), 6,71 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 2,28 (d, *J* = 7,7 Hz, 2H), 1,23 (m, 4H), 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

3.3.4. 7-hidroksi-3-(4-pentil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (4)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-heptin (0,053 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=100/1, zatim CH_2Cl_2/MeOH= 50/1). Izoliran je spoj **4** (41,3 mg; 27,6%; T_t= 184-186°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,87 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,30 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,85 (s, 1H), 2,76 – 2,65 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,40 – 1,28 (m, 4H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

3.3.5. 3-(4-heksil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (5)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-oktin (0,059 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH= 50/1). Izoliran je spoj **5** (42,9 mg; 27,4%; T_t= 150-152°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,56 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,95 (d, 1H), 7,75 (d, 1H), 2,28 (m, 2H), 1,51 (s, 2H), 1,27 (m, 6H), 0,86 (t, *J* = 5,1 Hz, 3H).

3.3.6. 3-(4-heptil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (6)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-nonin (0,066 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min

hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH= 100/1). Izoliran je spoj **6** (90,2 mg; 55,2%; T_t= 138-140°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,53 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,72 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,88 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 6,81 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 2,89 (m, 2H), 2,79 – 2,63 (m, 2H), 2,59 – 2,47 (m, 2H), 1,36 – 1,19 (m, 6H), 0,85 (t, *J* = 6,9 Hz, 3H).

3.3.7. 7-hidroksi-3-(4-oktil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (7)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-decin (0,072 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH= 100/1). Izoliran je spoj **7** (50,1 mg; 29,4%; T_t= 178-180°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,86 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,73 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,6, 2,2 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 2,76 – 2,63 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,27 (m, 10H), 0,85 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

3.3.8. 7-hidroksi-3-(4-(2-hidroksietil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (8)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 3-butin-1-ol (0,030 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1, zatim CH_2Cl_2/MeOH= 20/1). Izoliran je spoj **8** (29,9 mg; 22%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,87 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,75 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J* = 12,0, 6,7 Hz, 2H), 2,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H).

3.3.9. 7-hidroksi-3-(4-(3-hidroksipropil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (9)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 4-pentil-1-ol (0,037 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1, zatim CH_2Cl_2/MeOH= 20/1). Izoliran je spoj **9** (126,4 mg; 88,1%; T_t= 218-220°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,87 (s, 1H), 8,56 (s, 1H), 8,34 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,90 (dd, *J* = 8,5, 2,3 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 4,75 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 3,69 (dd, *J* = 12,0, 6,7 Hz, 2H), 2,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H).

3.3.10. 7-hidroksi-3-(4-(1-hidroksietil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (10)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 3-butin-2-ol (0,031 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **10** (119,5 mg; 87,5%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,88 (s, 1H), 8,57 (s, 1H), 8,35 (s, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,91 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,40 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 4,91 (dd, *J* = 11,9, 6,0 Hz, 1H), 1,46 (d, *J* = 6,5 Hz, 3H).

3.3.11. 7-hidroksi-3-(4-(1-hidroksiheksil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (11)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-oktin-3-ol (0,058 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1, zatim CH_2Cl_2/MeOH= 20/1). Izoliran je spoj **11** (82,7 mg; 50,3%; T_t= 139-141°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,87 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 8,33 (s, 1H), 7,75 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,91 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,85 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 5,34 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 4,78 – 4,66 (m, 1H), 1,76 (m, 2H), 1,46 – 1,16 (m, 5H), 0,86 (m, 2H).

3.3.12. 7-hidroksi-3-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (12)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te fenilacetilen (0,044 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=100/1, zatim CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **12** (77,7 mg; 51%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,92 (s, 1H), 9,00 (s, 2H), 8,65 (s, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 7,49 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 7,38 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 6,93 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 2H), 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 2H).

3.3.13. 7-hidroksi-3-(4-(p-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (13)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te p-tolilacetilen (0,051 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **13** (37.4 mg; 23,4%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,93 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,95 (s, 3H), 7,84 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 6,93 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 2,35 (s, 3H).

3.3.14. 7-hidroksi-3-(4-(4-pentilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (14)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-etinil-4-pentilbenzen (0,078 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min

zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **14** (38,3 mg; 20,4%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,92 (s, 1H), 8,94 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,85 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,31 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 6,93 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 2,66 – 2,58 (m, 2H), 1,59 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,31 (d, *J* = 3,2 Hz, 4H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H).

3.3.15. 7-hidroksi-3-(4-(4-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (15)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 4-metoksifenilacetilen (0,052 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=100/1). Izoliran je spoj **15** (52,0 mg; 31%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,92 (s, 1H), 9,80 (s, 1H), 8,89 (s, 1H), 8,64 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,67 (d, *J* = 11,8 Hz, 1H).

3.3.16. 7-hidroksi-3-(4-(2-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (16)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 2-etinilanisol (0,052 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **16** (47,0 mg; 28,1%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,94 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,64 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,41 (dd, *J* = 11,3, 4,5 Hz, 1H), 7,33 (dd, *J* = 7,5, 1,6 Hz, 1H), 7,09 – 6,98 (m, 1H), 6,88 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,79 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,72 – 6,63 (m, 1H), 3,60 (s, 2H).

3.3.17. 7-hidroksi-3-(4-(3-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (17)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 3-metoksifenilacetilen (0,051 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=20/1). Izoliran je spoj **17** (33,5 mg; 20%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,93 (s, 1H), 9,04 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,53 (t, *J* = 5,8 Hz, 2H), 7,40 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H), 6,98 – 6,90 (m, 2H), 6,88 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H).

3.3.18. 7-hidroksi-3-(4-(3-hidroksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (18)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 3-hidroksifenilacetilen (0,044 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=20/1). Izoliran je spoj **18** (115,8 mg; 72,1%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,93 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,65 (s, 1H), 7,77 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,27 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 6,93 (dd, *J* = 8,5, 2,2 Hz, 1H), 6,88 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 6,77 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H).

3.3.19. 3-(4-(4-fluorfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (19)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-etinil-4-fluorbenzen (0,046 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **19** (40,3 mg; 24,9%; T_t= >250°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10,56 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,04 – 7,99 (m, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,53 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,33 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H), 6,97 – 6,91 (m, 1H), 6,88 (s, 1H), 6,20 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H).

3.3.20. 3-(4-(3,5-bis(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-7-hidroksi-2*H*-kromen-2-on (20)

Spoj **2** (100 mg; 0,5 mmol) stavljen je u kvarcnu kivetu i otopljen u 0,5 mL DMF-a i smjesi *tert*-butanol:voda (1:1) (4 mL). U otopinu je dodana 1 M otopina bakrovog(II)sulfata (0,12 mL) i bakar (25,4 mg; 0,4 mmol) te 1-etinil-3,5-bis(trifluormetil)benzen (0,071 mL; 0,4 mmol) i kvarcna kiveta stavljena u mikrovalni reaktor na 80°C tijekom 60 min sa prethodnim 5 min zagrijavanja te 10 min hlađenja na kraju. Tijek reakcije praćen je TLC-om, a nakon završetka reakcijska smjesa je uparena i pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH=50/1). Izoliran je spoj **20** (74,6 mg; 33,8%; T_t= 223-225°C).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9,52 (s, 1H), 8,70 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,95 (s, 2H), 7,80 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,89 (s, 1H).

3.3.21. 7-hidroksi-4-metil-3-((3-metoksifenil)etinil)-2*H*-kromen-2-on (21)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (150 mg; 0,71 mmol) otopljen je u DMF-u (4 mL) te je dodan CuI (26,8 mg; 0,14 mmol), Et_3N (0,1 mL; 0,71 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (82 mg; 0,07 mmol) i 3-metoksifenilacetilen (0,14 mL; 1,06 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH = 100/1) pri čemu je dobiven smeđi uljasti spoj **21** (3 mg; 1,4 %).

^{1}H NMR (300 MHz, σ/ppm): 9,82 (1H, s, OH); 7,96 (1H, s, H-4'); 7,65 (2H, m, H-5, H-6'); 7,20 (1H, t, *J*=7,6 Hz, H-7'); 6,84 (3H, m, H-6, H-8, H-8'); 4,12 (3H, s, OCH_3).

3.3.22. 7-hidroksi-4-metil-3-((4-metoksifenil)etinil)-2*H*-kromen-2-on (22)

7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarin (150 mg; 0,71 mmol) otopljen je u DMF-u (4 mL) te je dodan CuI (26,8 mg; 0,14 mmol), Et_3N (0,2 mL; 1,42 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (82 mg; 0,07 mmol) i 4-metoksifenilacetilen (0,14 mL; 1,06 mmol). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Potom je otapalo upareno pod sniženim tlakom, a smjesa pročišćena kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2/MeOH = 100/1) pri čemu je dobiven žuto-smeđi uljasti spoj **22** (1,8 mg; 0,8 %).

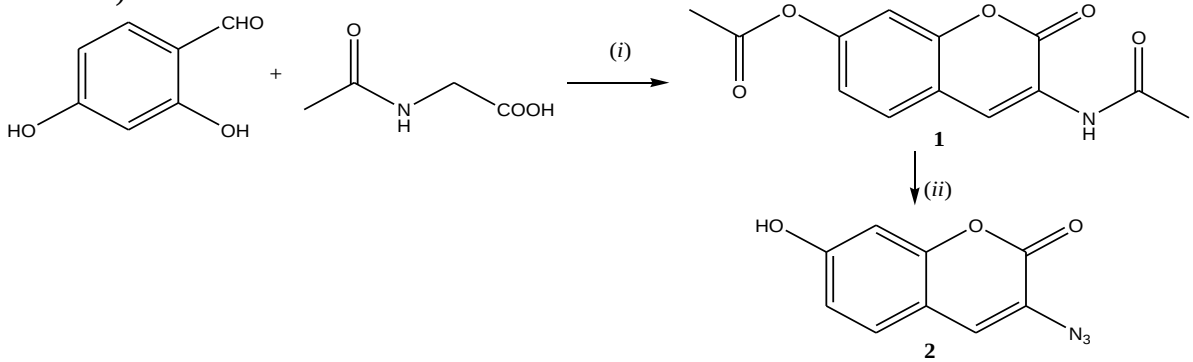
^{1}H NMR (300 MHz, σ/ppm): 10,12 (1H, s, OH); 7,78 (3H, m, H-5, H-5',5''); 7,03 (2H, d, *J*=7,7 Hz, H-4',4'''); 6,81 (1H, d, *J*=7,8 Hz, H-6); 6,70 (1H, d, *J*=3,1 Hz, H-8); 3,96 (3H, s, OCH_3

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SINTEZE SPOJEVA

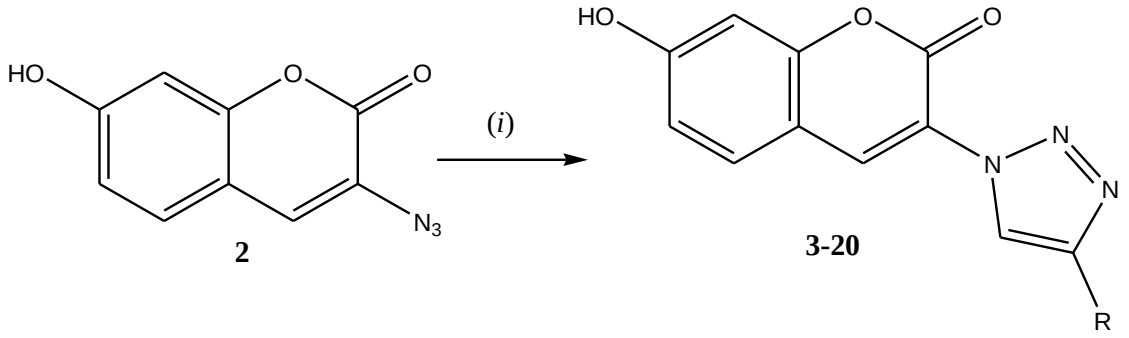
U ovom radu sintetizirani su C-3 supstituirani derivati kumarina (**3**-**22**) bakrom i paladijem kataliziranim reakcijama. „Klik“ reakcijama 3-azido-7-hidroksi kumarina (**2**) s odgovarajućim terminalnim alkinima pripravljeni su 3-(1,2,3-triazolni) derivati 7-hidroksikumarina (**3**-**20**), dok su Sonogashira-inom reakcijom 7-hidroksi-4-metilkumarina s terminalnim alkinima sintetizirani derivati kumarina s ariletinilnim supstituentima u položaju 3 kumarina (**21**, **22**).

3-azido-7-hidroksi kumarin (**2**), početni spoj za „klik“ reakcije, pripravljen je višestupnjevitom sintezom bez izoliranja međuprodukta 3-acetamido-7-*O*-acetilkumarina (**1**) (Shema 1.). U prvom stupnju Perkinovom reakcijom 2,4-dihidroksibenzaldehida s *N*-acetilglicinom u anhidridu octene kiseline nastaje azlakton, koji podliježe enolizaciji pri čemu se u aldolnoj kondenzaciji zatvara kumarinski prsten reakcijom azlaktonskog međuprodukta (nukleofila) i anhidrida (elektrofila). Reakcija uključuje i dvije reakcije esterifikacije s 2,4-dihidroksi skupinom i reakciju dehidratacije alkohola nastalog aldolnom reakcijom, pri čemu nastaje α,β-nezasićeni lakton, 3-acetamido-7-*O*-acetilkumarin (**1**). Reakciji pogoduju i konjugacija dvostruke veze s karbonilnom skupinom i aromatski prsten. Reakcijom nastalog međuprodukta s klorovodičnom kiselinom dolazi do hidrolize acetilnih skupina na položaju 3 i 7 kumarina pri čemu nastaje 3,7-dihidroksi kumarin. Hidrolizom amida u amin, nastali amin reagira s $NaNO_2$ u kiselom mediju pri čemu nastaje diazonijeva sol (reakcija diazotacije). Potom reakcijom *in situ* $NaNO_2$ i HCl-a dolazi do stvaranja dušične kiseline pri čemu se oslobađaju reaktivni NO^+ ioni. Slobodni elektronski par na aminu omogućuje mu nukleofilni napad na stvorene NO^+ ione uslijed čega nakon uspostavljanja kiselo-bazne ravnoteže nastaje diazonijeva sol stabilizirana rezonancijom. Naposlijetku, dodatkom NaN_3 dolazi do nukleofilne supstitucije i nastajanja krajnjeg produkta, 3-azido-7-hidroksikumarina (**2**) (Shema 1.).

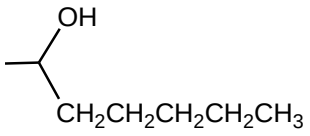
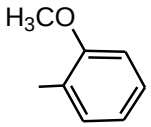
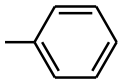
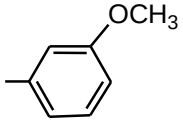
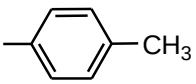
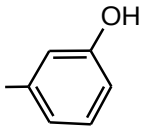
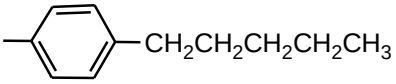
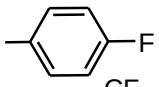
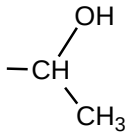
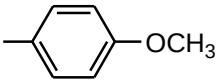
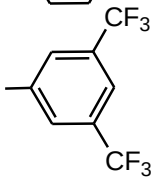


Shema 1: Reagensi i uvjeti: (*i*) bezvodni NaOAc/ Ac_2O/ refluks, 4h; (*ii*) HCl:Etanol 2:1/ $NaNO_2/NaN_3$

„Klik“ reakcijom, tj. Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom kataliziranom bakrom i potpomognutom mikrovalnim zračenjem 3-azido-7-hidroksikumarina (**2**) s odgovarajućim terminalnim alkinima sintetizirani su 3-(4-alkil-1,2,3-triazolilni) (**3**-**11**) i 3-(4-aril-1,2,3-triazolilni)kumarinski derivati (**12**-**20**). (Shema 2.).

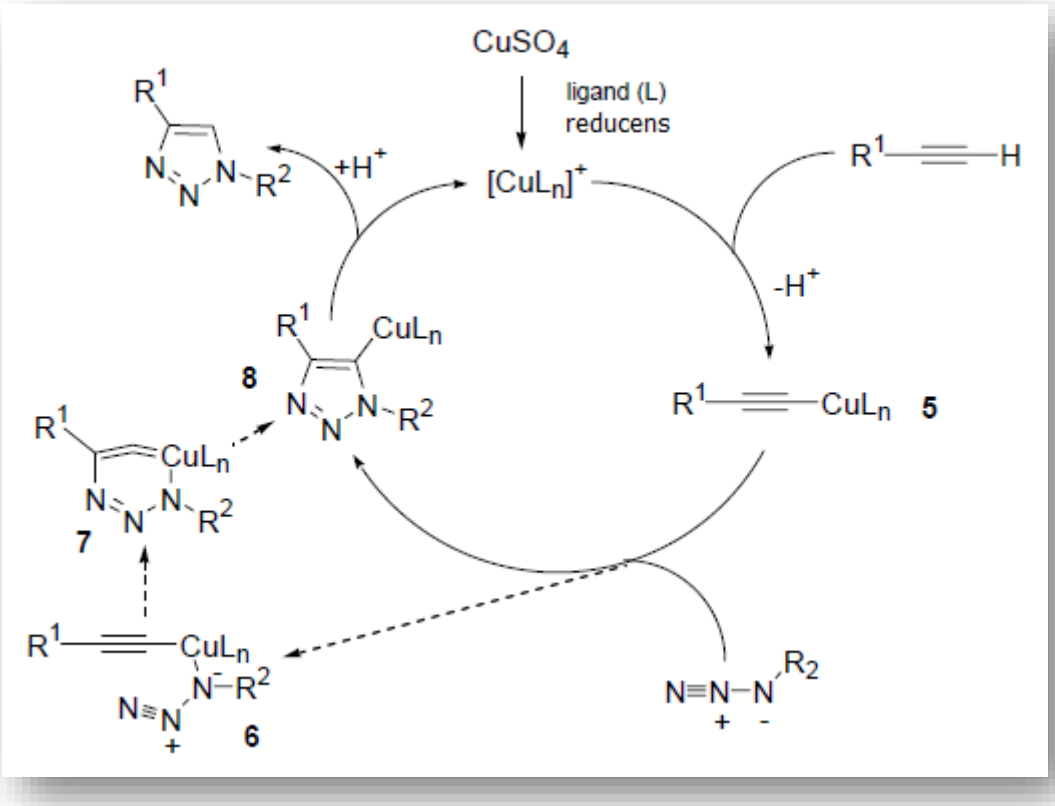


2 **3-20**

spoj	R	spoj	R	spoj	R
3	$-CH_2CH_2CH_2CH_3$	**11**		**16**	
4	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$				
5	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**12**		**17**	
6	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$	**13**		**18**	
7	$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$				
8	$-CH_2CH_2OH$	**14**		**19**	
9	$-CH_2CH_2CH_2OH$				
10		**15**		**20**	

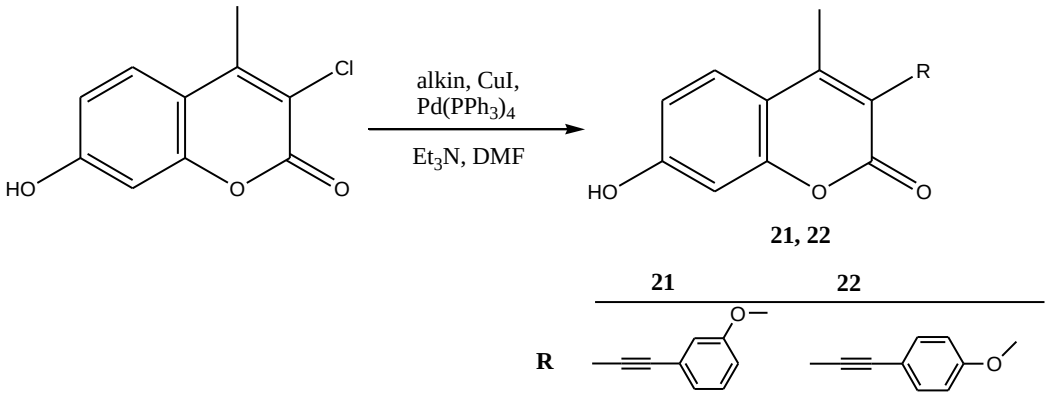
Shema 2: Reagensi i uvjeti: (*i*) terminalni alkin, Cu, $CuSO_4$, H_2O: *tert*-BuOH=1:1, DMF, 80°C, 60 min, 300 W

Predloženi mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije započinje stvaranjem π kompleksa sa trostrukom vezom terminalnih alkina pri čemu nastaje međuprodukt, bakrov(I) acetilid koji u reakciji s azidom daje šesteročlane metalocikličke strukture bakra (III). Pregradnjom bakar (III) cikličkog kompleksa, nastaje 1,2,3-triazol (Shema 3.).



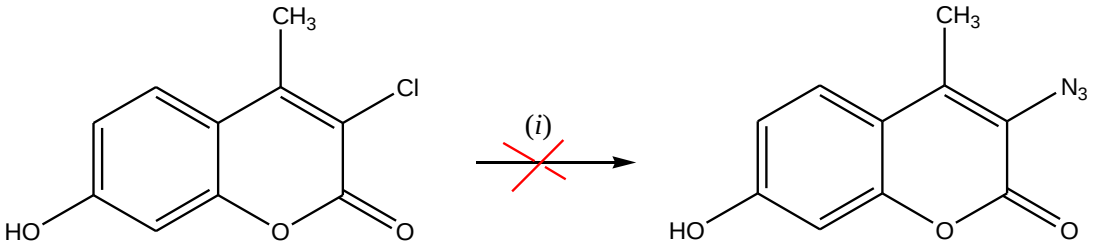
Shema 3. Mehanizam Huisgenove 1,3-dipolarne cikloadicije katalizirane bakrom

Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim feniletinom (3-metoksifenilacetilen i 4-metoksifenilacetilen) i u prisutnosti Pd-katalizatora (tetrakis(trifenilfosfin)paladij(0)), kokatalizatora CuI i trietilamina u DMF-u sintetizirani su 3-ariletinil-7-hidroksi-4-metilkumarini (**21**, **22**) (Shema 4.).



Shema 4. Sonogashira-ina reakcija sinteze C-3 alkinilnih derivata kumarina

“One pot” reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina (0,47 mmol), NaN_3 (0,56 mmol), L-prolina (0,14 mmol) i NaOH (0,14 mmol) u 4 mL EtOH/H_2O (7:3) na 70°C tijekom 48h nije sintetiziran 3-azido-7-hidroksi-4-metilkumarin koji je trebao poslužiti kao početni spoj za „klik“ reakcije. “One pot” reakcija provedena je i u DMSO-u, no željeni 3-azido derivat kumarina nije izoliran (Shema 5.)

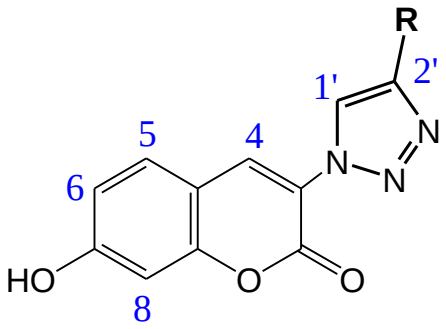


Shema 5. Reagensi i uvjeti: (*i*) CuI/NaN_3/L-prolin/NaOH/EtOH:H_2O ili DMSO/70°C/48h

4.2. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NOVOPRIPRAVLJENIH SPOJEVA ^{1}H NMR SPEKTROSKOPIJOM

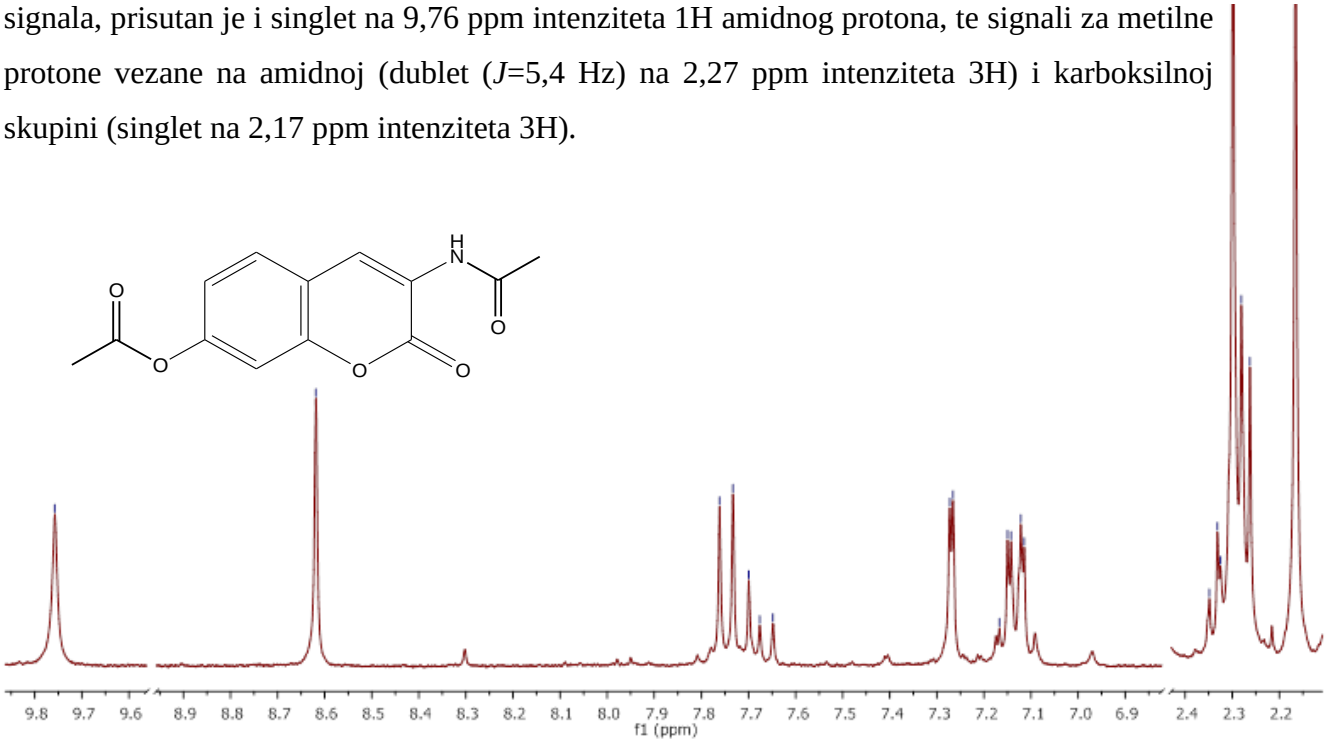
4.2.1. Analiza spektara ^{1}H NMR derivata kumarina s 1,2,3-triazolom u položaju C-3

Asigniranje ^{1}H NMR spektara provedeno je na osnovu kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega.



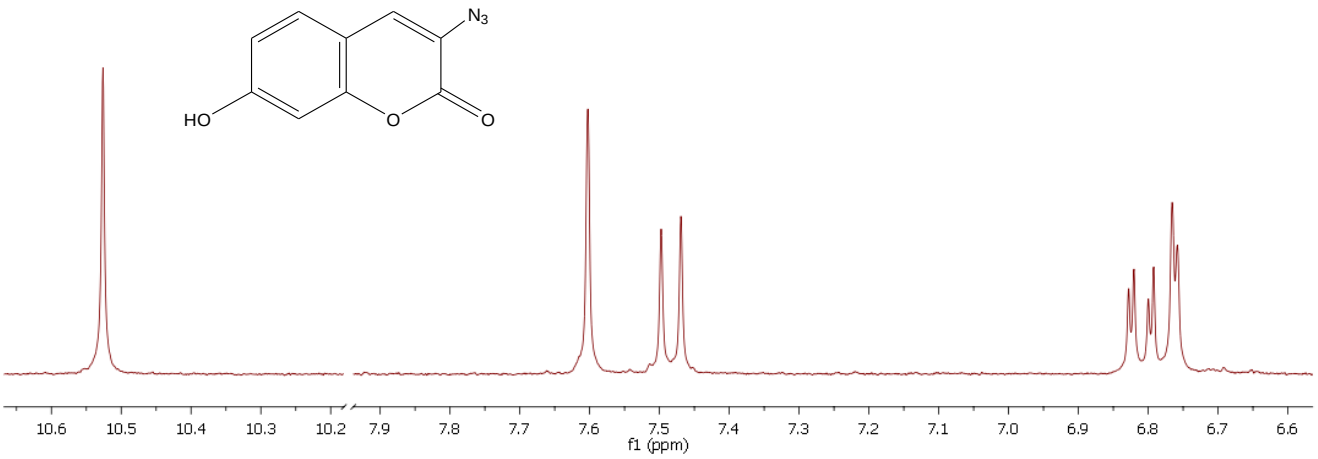
Spektri ^{1}H NMR spojeva **3-20** (prilozi 3-20) pokazuju signale protona kumarinskog prstena uz prisustvo protona 1,2,3-triazolnog prstena na temelju čega je potvrđeno da je „klik“ reakcijom uveden supstituirani triazolni prsten u položaj C-3 kumarina.

U ^{1}H NMR spektru acetamidnog derivata kumarina (**1**) (Slika 1.) prisutni su signali za protone kumarinskog prstena čime je dokazan nastanak kumarinskog derivata Perkinovom ciklizacijom. U spektru su prisutni signali: singlet na 8,62 ppm intenziteta 1H za proton H-4, multiplet na 7,70 ppm intenziteta 1H za H-5 proton, dublet na 7,27 ppm (J=2,1 Hz) intenziteta 1H za H-8 proton i multiplet na 7,14 ppm intenziteta 1H za H-6 proton. Pored navedenih signala, prisutan je i singlet na 9,76 ppm intenziteta 1H amidnog protona, te signali za metilne protone vezane na amidnoj (dublet (J=5,4 Hz) na 2,27 ppm intenziteta 3H) i karboksilnoj skupini (singlet na 2,17 ppm intenziteta 3H).



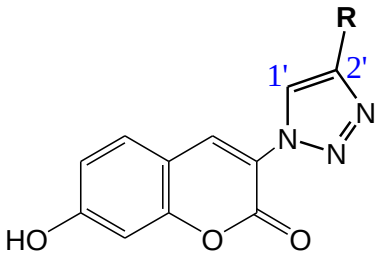
Slika 1. ^{1}H NMR spektar acetamidnog derivata kumarina (**1**)

Usporedbom ^{1}H NMR spektara spoja **2** (Slika 2.) i spoja **1**, može se uočiti da spektar spoja **2** pokazuje signale za protone kumarinske jezgre uz istovremeni izostanak s signala za amidni proton i protone metilne skupine vezane za amidnu i karboksilnu skupinu čime je potvrđeno nastajanje 3-azido derivata kumarina **2**.

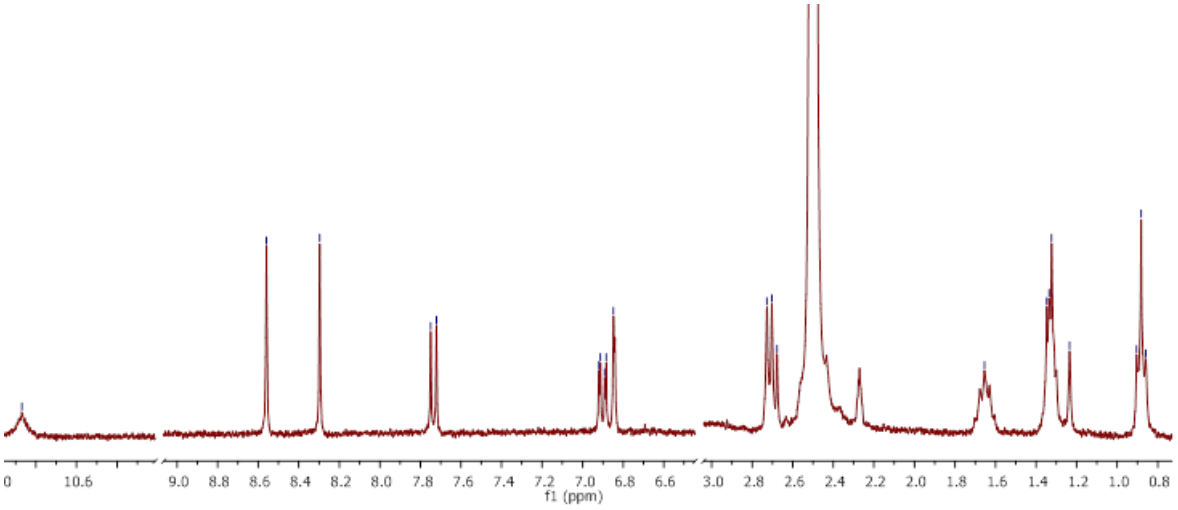


Slika 2. ^{1}H NMR spektar spoja **2**

U ^{1}H NMR spektrima spojeva **3-11** pored signala kumarinskog prstena prisutan je signal na ~9 ppm (H-1') za proton triazolnog prstena, te u alifatskom području signali za metilenske i metilne protone (prilozi 3-11).

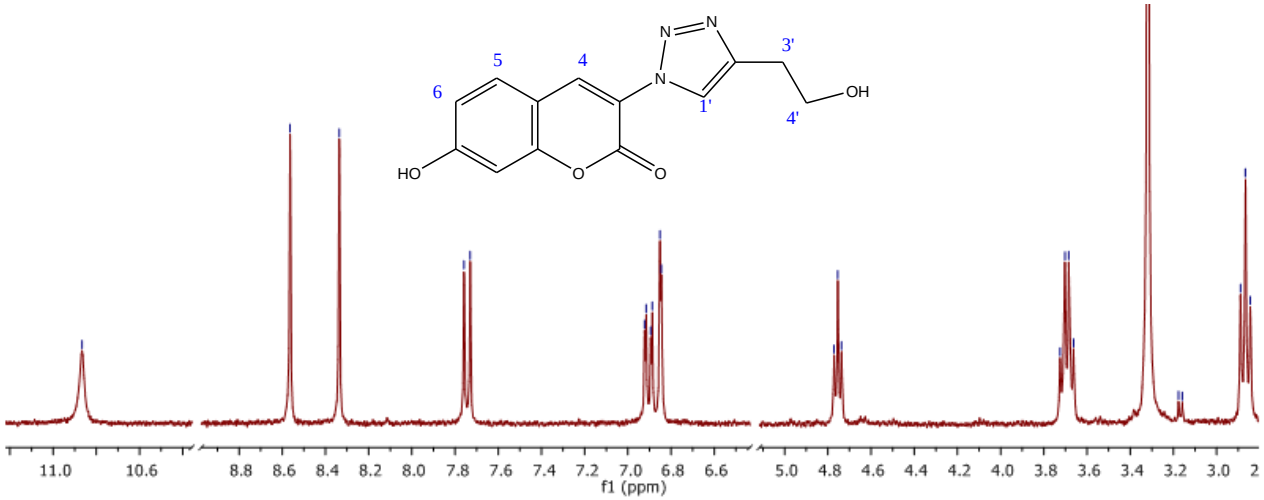


^{1}H NMR spektar spoja **4** (Slika 3.) pokazuje signale za protone kumarinskog prstena (singlet intenziteta 1H na 8,30 ppm za H-4, dublet intenziteta 1H na 7,74 ppm za H-5, dublet dubleta intenziteta 1H na 6,90 ppm za H-6, dublet intenziteta 1H na 6,85 ppm za H-8), signal za proton hidroksilne skupine na 10,87 ppm, singlet intenziteta 1H za proton triazolnog prstena i signale za pentilni supstituent u položaju 4 triazola u alifatskom području (singlet inteziteta 1H na 8,56 ppm za H-1', triplet intenziteta 2H na 2,76-2,65 ppm za H-3', multiplet intenziteta 2H na 1,65 ppm za H-4', multiplet intenziteta 4H na 1,40-1,28 ppm za H-5', 6' i triplet intenziteta 3H na 0,88 pm za CH_3).



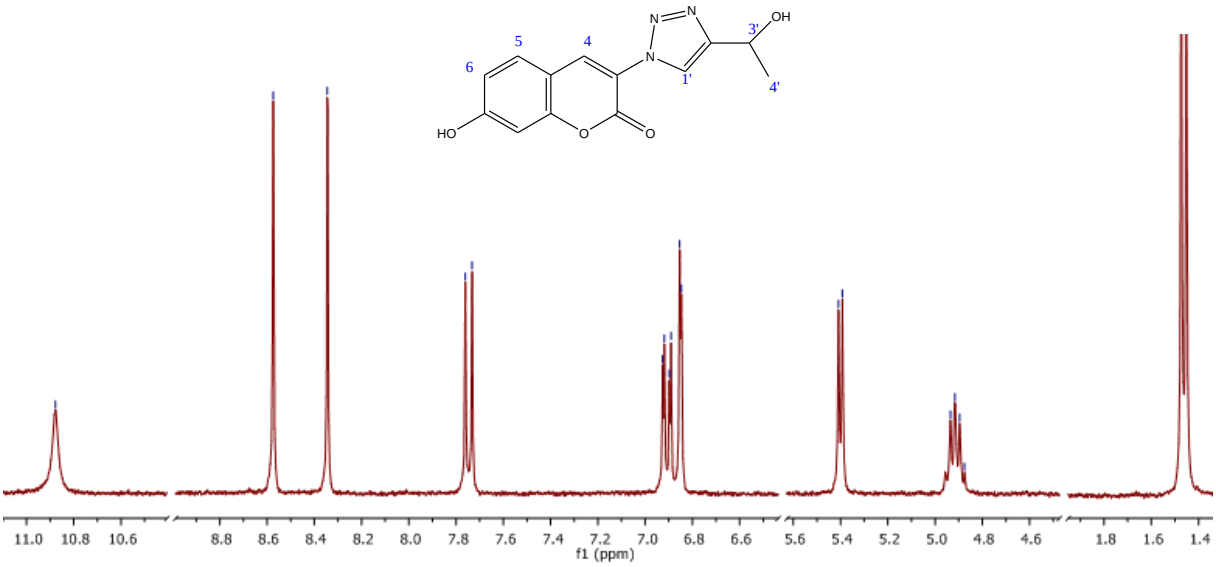
Slika 3. ^{1}H NMR spektar spoja **4**

U ^{1}H NMR spektru spoja **8** (Slika 4.) vidljivi su uz signale za protone kumarinske jezgre i hidroksilne skupine (10,87 ppm (s, 1H, OH), 8,34 ppm (s, 1H, H-4), 7,74 ppm (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-5), 6,90 ppm (dd, *J* = 8,5; 2,3 Hz, 1H, H-6) i 6,85 ppm (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, H-8) i singlet intenziteta 1H na 8,56 ppm za proton triazolnog prstena (H-1'), te triplet intenziteta 1H na 4,75 ppm za hidroksilni proton, dublet dubleta intenziteta 2H na 3,69 ppm za H-4' i triplet intenziteta 2H na 2,87 ppm za H-3'.



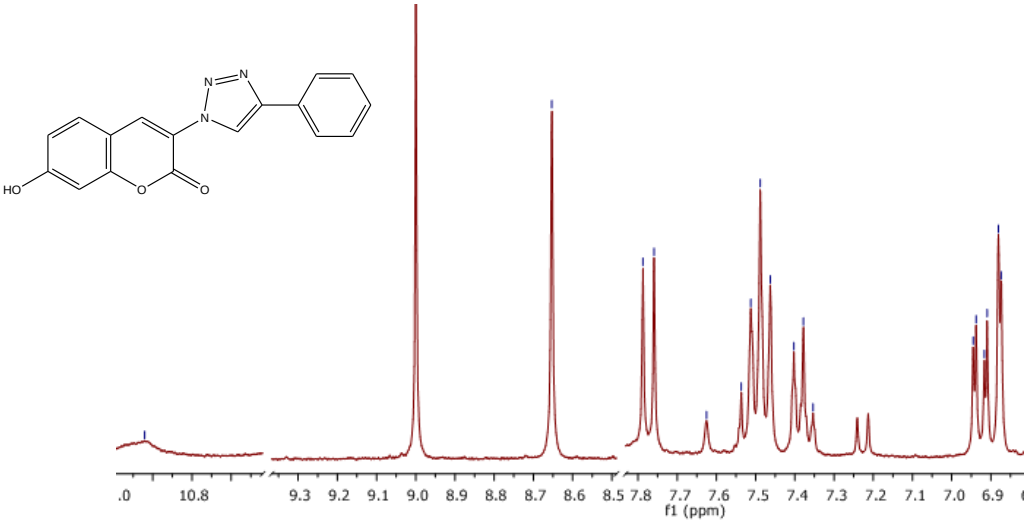
Slika 4. ^{1}H NMR spektar spoja **8**

^{1}H NMR spektar spoja **10** (Slika 5.) razlikuje se od spektra spoja **8** u alifatskom dijelu gdje pokazuje signale: dublet intenziteta 1H na 5,40 ppm za OH, dublet dubleta intenziteta 1H na 4,91 ppm za H-3' i dublet intenziteta 3H na 1,46 ppm za CH_3 (H-4').



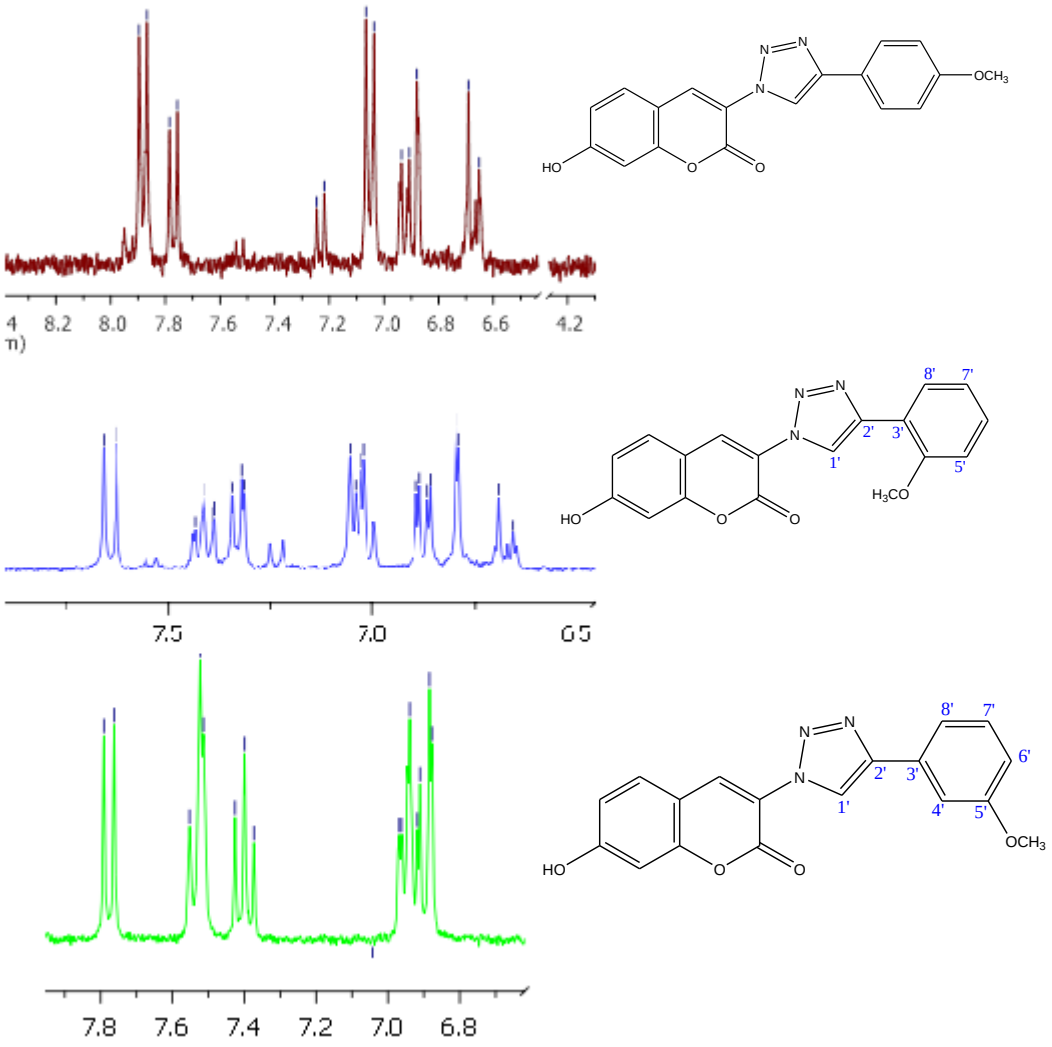
Slika 5. ^{1}H NMR spektar spoja **10**

U ^{1}H NMR spektru spoja **12** (Slika 6.) vidljivi su uz signale za protone kumarinske jezgre, hidroksilne skupine i triazolnog prstena i dodatni signali u aromatskom dijelu spektra: triplet intenziteta 3H na 7,49 ppm za H-4',4",6' i triplet intenziteta 2H na 7,38 ppm za H-5',5".



Slika 6. ^{1}H NMR spektar spoja **12**

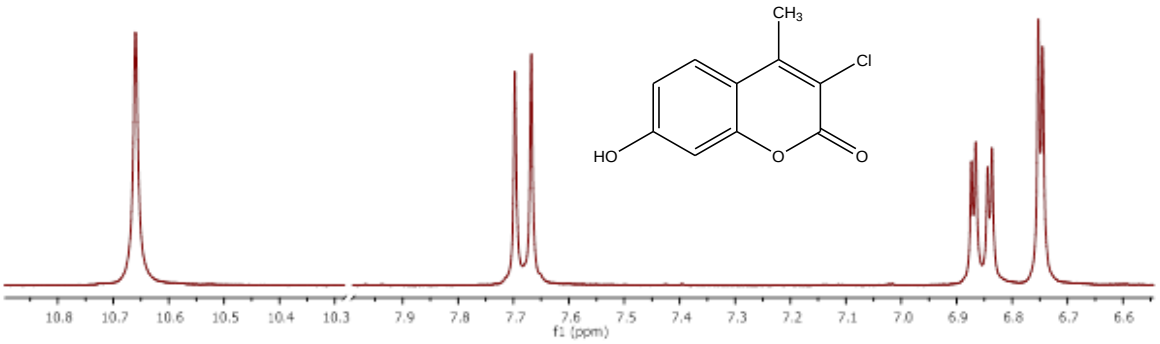
Usporedbom ^{1}H NMR spektara spojeva **15-17** mogu se uočiti uz signale za protone kumarinskog i triazolnog prstena i prisustvo novih signala za fenilne protone u aromatskom području i u alifatskom području singlet intenziteta 3H za protone metoksi skupine na ~4 ppm. ^{1}H NMR spektri spojeva **15-17** razlikuju se u aromatskom dijelu spektra u multiplicitetima zbog različite kemijske okoline fenilnih protona.



Slika 7. Usporedni ^{1}H NMR spektri spojeva **15-17**

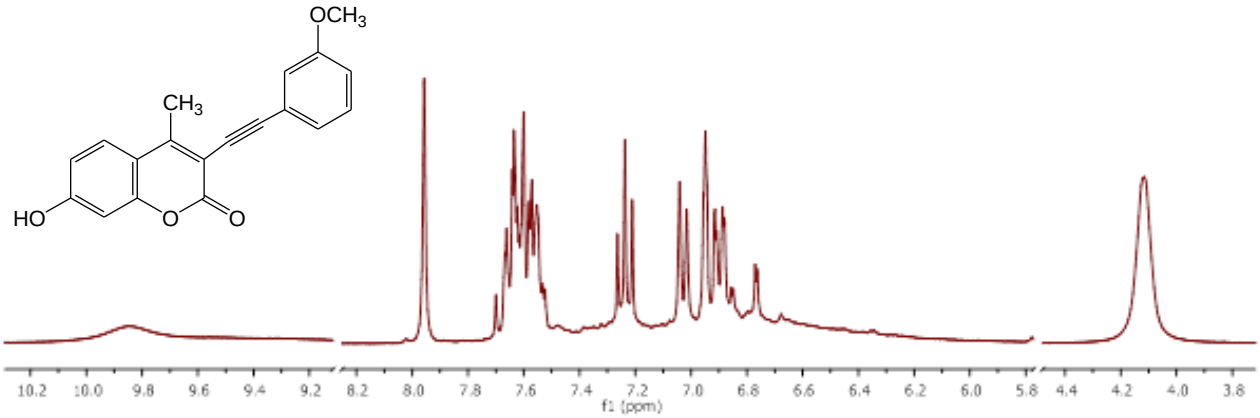
4.2.2. Analiza spektara ^{1}H NMR derivata kumarina 21 i 22

U ^{1}H NMR spektru početnog spoja, 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina (Slika 8.) prisutni su signali: singlet za hidroksilni proton na 10,66 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 1H za proton H-5 na 7,68 ppm (J = 8,8 Hz), dublet dubleta za proton H-6 na 6,85 ppm intenziteta 1H, dublet intenziteta 1H za proton H-8 na 6,75 ppm (J = 2,3 Hz) i signal za metilne protone ~ 2,5 ppm koji je prekriven signalom dimetilsulfoksida.



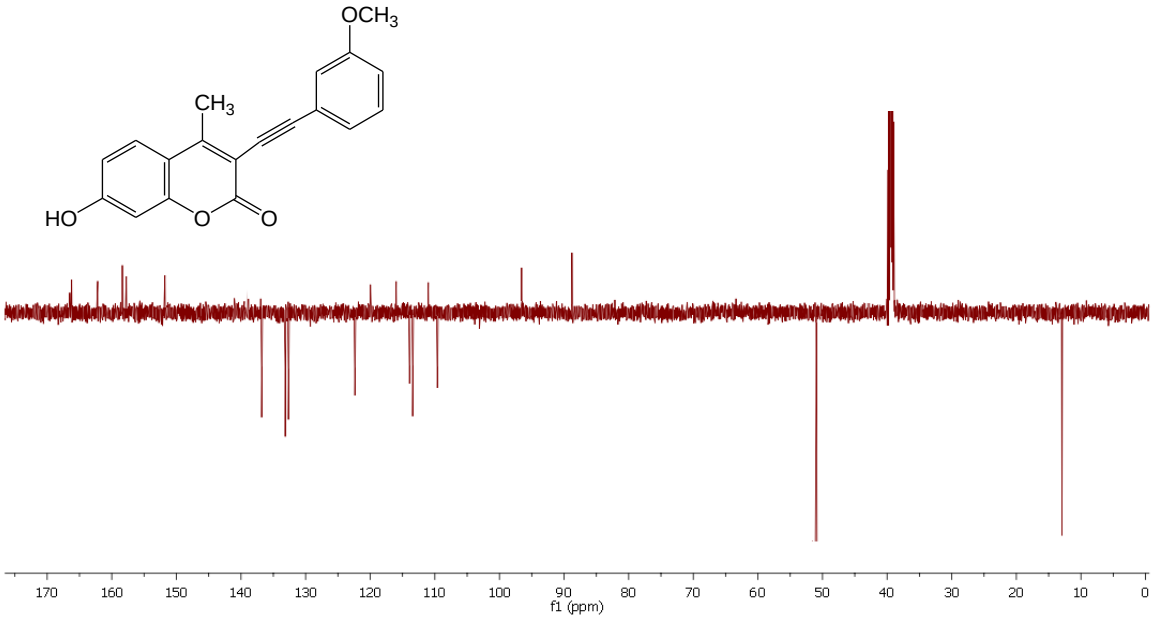
Slika 8. ^{1}H NMR spektar 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina

Usporedbom ^{1}H NMR spektra početnog spoja (7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina) i spektra spoja **21** (Slika 9.), uz signale za protone kumarinskog prstena prisutni su i novi signali za fenilne protone u aromatskom području (H-5' na 7,96 ppm; H-6' na 7,65 ppm; H-7' na 7,20 ppm; H-8' na 6,90 ppm) i u alifatskom području singlet intenziteta 3H za protone metoksi skupine na 4,12 ppm.



Slika 9. ^{1}H NMR spektar spoja **21**

U ^{13}C NMR spektru spoja **21** (Slika 10.) prisutni su signali kumarinskog prstena u aromatskom području (C-4 na 164,8 ppm; C-7 na 162,2 ppm; C-2 na 158,8 ppm; C-8a na 151,6 ppm; C-4 na 132,4 ppm; C-4a na 120,0 ppm; C-6 na 113,1 ppm; C-3 na 111,3 ppm i C-8 na 110,0 ppm) i signal za metilni ugljik na 13,2 ppm. Pored signala kumarinskog prstena prisutni su i signali (o-metoksifenil)etinilnog supstituenta u položaju 3 kumarina: C-4' na 164,7 ppm, C-8' na 136,8 ppm, C-6' na 134,6 ppm, C-7' na 121,1 ppm, C-3' na 115,2 ppm, C-5' na 114,8 ppm, C-2' na 96,3 ppm, C-1' na 89,5 ppm i signal za ugljik metoksi skupine na 50,1 ppm.

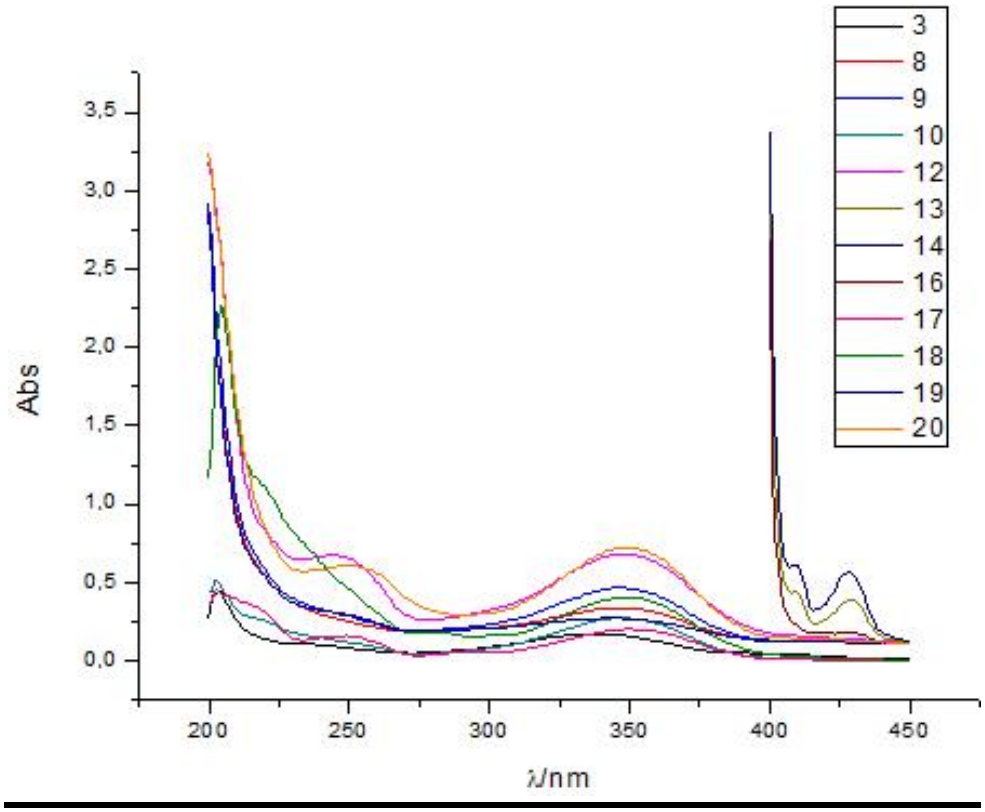


Slika 10. ^{13}C NMR spektar spoja **21**

^{1}H NMR spektar spoja **22** pokazuje u odnosu na spektar spoja **21** razliku u multiplicitetima u aromatskom dijelu spektra.

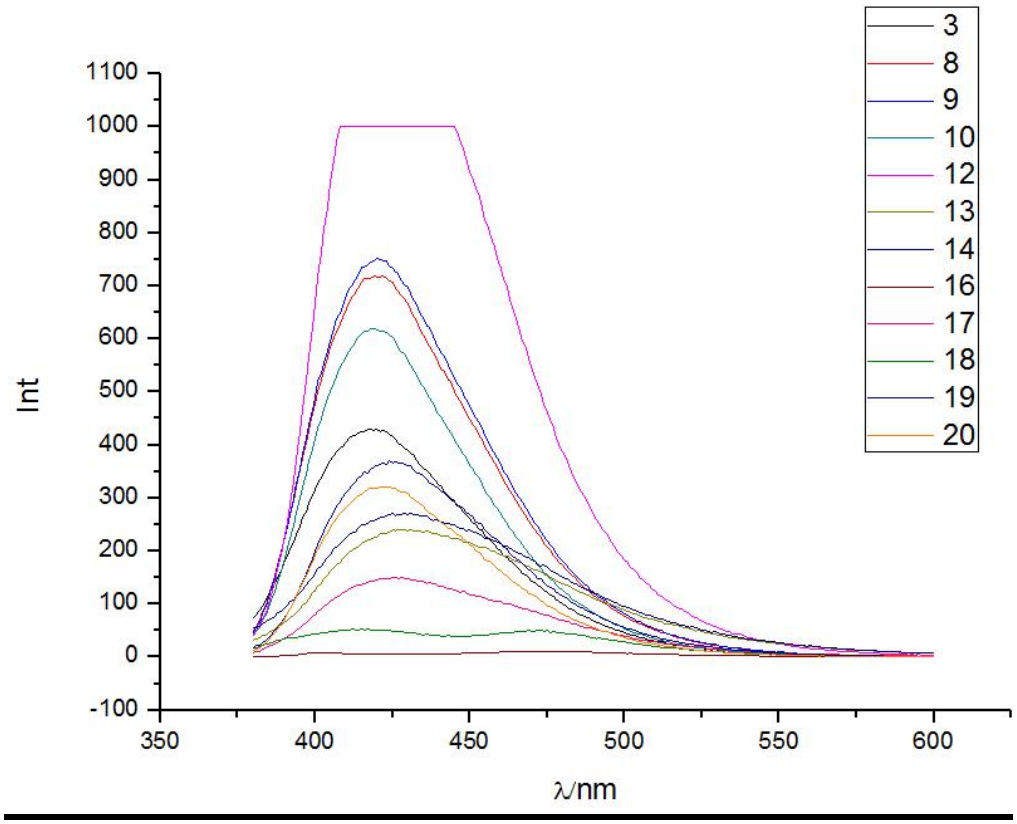
4.3. SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJEVA UV/VIS I FLUORIMETRIJSKOM SPEKTROSKOPIJOM

UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom analizirani su derivati kumarina s 1,2,3-triazolnim supstituentima u položaju C-3 (**3**, **8-10**, **12-20**) te su im određeni maksimumi apsorbancije, molarni ekstinkcijski koeficijenti, valne duljine emisije i Stokes-ovi pomaci**.** UV/Vis spektri svih ispitivanih spojeva snimljeni su kod koncentracije 2,0 x 10^{-5} moldm^{-3} u metanolu. Spojevi **12** i **20** pokazuju najviše apsorpcijske maksimume na 350 i 210 nm dok ostali spojevi pokazuju batokromni pomak apsorpcijskih maksimuma u području 340-370 nm. Triazolilni derivati kumarina **3**, **10** i **17** imaju očekivano najniže vrijednosti apsobancije. Apsorpcijski maksimumi spojeva **13**, **16** i **19** su pomaknuti prema većim valnim duljinama i imaju apsorpcijske maksimume na 405 i 425 nm (Slika 11.).



Slika 11. UV/Vis spektri triazolilnih derivata kumarina **3**, **8-10**, **12-20** (c= 2,0 x 10^{-5} $moldm^{-3}$)

Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja provedena su zbog visoke osjetljivosti metode pri koncentraciji 1x10^{-6} $moldm^{-3}$ u metanolu. Otopine pripravljenih spojeva su pobuđene svjetlošću valne duljine ekscitacije (λ_{ex}) koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorbancije (λ_{max}). Na slici 26 su prikazani emisijski fluorimetrijski spektri spojeva snimani pri danoj koncentraciji u metanolu. Triazolilni derivati kumarina **16-18** ne pokazuju značajnu fluorescenciju. Spoj **12** pokazuje najveći intenzitet emisije pri valnoj duljini 425 nm (Slika 12, Tablica 1). Većina novosintetiziranih spojeva pokazuju da je Stokes-ov pomak maksimuma apsorbancije < 100 nm, dok spojevi **16** i **18** pokazuju Stokes-ov pomak >100 nm.



Slika 12. Emisijski spektri spojeva **3**, **8-10**, **12-20** (c = 1 x 10^{-6} moldm^{-3})

Tablica 1. UV/Vis i fluorimetrijski podatci za spojeve **3**, **8-10**, **12-20**

Spoj	λ_{max} (nm)	Abs	ε_{max} ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Stokes-ov pomak (nm)
3	340	0,173913	870	340	417	77
8	345	0,336842	1684	350	423	73
9	346	0,464372	2322	350	423	73
10	347	0,274233	1371	350	427	77
12	349	0,679766	3399	350	425	75
13	346	0,389921	1950	350	425	75
14	342	0,568380	2842	350	425	75
16	360	0,172036	860	360	463	103
17	350	0,201227	1006	350	410	60
18	349	0,403068	2015	350	464	114
19	344	0,273715	1368	350	425	75
20	348	0,724012	3620	350	423	73

4.4. *In silico* analiza novopripravljenih spojeva (1-19)

Softverskim paketom PASS predviđeni su spektri aktivnosti spojeva na temelju 2D strukturne formule biološki aktivnih tvari (Tablica 3.). S obzirom na aktivnosti istraživanih spojeva postoje dvije mogućnosti: P_a – mogućnost aktivnosti spoja i P_i – mogućnost ne-aktivnosti spoja. Najvjerojatnija predviđena aktivnost treba imati što veću vrijednost P_a i što manju vrijednost P_i.

3-azido-7-hidroksi-2H-kromen-2-on (**2**) pokazao je najveću vjerojatnost aktivnosti za CYP2C12, s faktorom P_a = 0,903, dok je 7-hidroksi-3-(4-(2-metoksifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2*H*-kromen-2-on (**16**) pokazao najveću vjerojatnost aktivnosti kao antineoplastik (rak dojke) s faktorom P_a=0,745 i P_i=0,005.

Od svih novopripravljenih spojeva ističu se spoj **1** kao antineoplastik s faktorom P_a=0,721 i P_i=0,004, spoj **3** kao agonist interleukina 2 sa faktorom P_a=0,581 i P_i=0,007, spoj **8** kao agonist integriteta membrane s faktorom P_a=0,792 i P_i=0,038, spoj **10** kao kardiovaskularni analeptik s faktorom P_a=0,444 i P_i=0,031 te spoj **4** s antimikobakterijskim farmakološkim djelovanjem i faktorom P_a=0,405 i P_i=0,038,

Tablica 2. Najvjerojatnije ljudske i virusne biološke mete i učinci predviđeni PASS-om za C-3-triazolilne derivate kumarina

Aktivnost spoja 1	Pa_1	Pi_1	Aktivnost spoja 2	Pa_2	Pi_2	Aktivnost spoja 3	Pa_3	Pi_3	Aktivnost spoja 4	Pa_4	Pi_4
Biološka meta			***Biološka meta***			***Biološka meta***			***Biološka meta***		
Supstrat CYP2C12	0,875	0,018	Supstrat CYP2C12	0,903	0,011	Agonist interleukina 2	0,581	0,007	Inhibitor taurin dehidrogenaze	0,474	0,099
Supstrat CYP2F1	0,851	0,002	Inhibitor aril-alkohol dehidrogenaze (NADP+)	0,762	0,004	Inhibitor spingozin kinaze	0,282	0,002	Inhibicija biosinteze stanične stijenke	0,360	0,006
Inhibitor CDP-glicerol glicerofosfotransferaze	0,862	0,017	Inhibitor P-benzokinon reduktaze (NADPH)	0,750	0,004	Inhibitor leukotrien-B4 20-monooksigenaze	0,551	0,018	Inhibicija sinteze leukotriena	0,325	0,011
Agonist čvrstoće membrane	0,848	0,025	Pojačivač ekspresije TP53	0,761	0,015	Inhibitor biosinteze stanične stijenke	0,361	0,005	Inhibitor spingozin kinaze	0,299	0,002
Inhibitor inzulizina	0,720	0,006	Inhibitor beta glukuronidaze	0,743	0,003	Substrat paraoksonaze	0,390	0,010			
Farmakološko djelovanje			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***		
Pojačivač antineoplastika	0,721	0,004	Kseonobiotik	0,721	0,004	Antineoplastik	0,744	0,019	Antimikobakterijsko	0,405	0,038
Antineoplastik	0,703	0,026				Antineoplastik (rak dojke)	0,695	0,005	Antifungalno	0,355	0,061
						Liječenje raka prostate	0,317	0,037	Antimutageno	0,325	0,036

Aktivnost spoja 5	Pa_5	Pi_5	Aktivnost spoja 6	Pa_6	Pi_6	Aktivnost spoja 7	Pa_7	Pi_7	Aktivnost spoja 8	Pa_8	Pi_8
Biološka meta			***Biološka meta***			***Biološka meta***			***Biološka meta***		
Agonist interleukina 2	0,586	0,006	Inhibitor leukotrien-B4 20-monooksigenaze	0,575	0,015	Agonist interleukina 2	0,586	0,006	Supstrat paraoksonaze	0,303	0,020
Inhibitor HIV-2 reverzne transkriptaze	0,223	0,025	Supstrat CYP2A3	0,429	0,013	Inhibitor nitrat reduktaze (citokrom)	0,589	0,029	Inhibitor tiroksin 5-dejodinaze	0,311	0,036
Inhibitor MAP kinaze	0,201	0,005	Inhibitor GABA aminotransferaze	0,321	0,095	Pojačivač ekspresije HMOX1	0,371	0,067	Agonist čvrstoće membrane	0,792	0,038
Inhibitor ekspresije NOS2	0,241	0,084	Regulator metabolizma lipida	0,324	0,119	Inhibitor beta-karoten 15, 15'-monooksigenaze	0,325	0,042	Inhibitor peroksidaze	0,374	0,055
Farmakološko djelovanje			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***		
Antineoplastik (rak dojke)	0,687	0,006	Liječenje makularne degeneracije	0,282	0,010	Antifungalno	0,355	0,061	Antibakterijsko	0,320	0,053
Kardiovaskularni analeptik	0,482	0,026	Liječenje proliferativnih bolesti	0,244	0,070	Liječenje raka prostate	0,315	0,038	Liječenje raka prostate	0,347	0,030
Fibrinolitik	0,377	0,164	Spazmolitik	0,301	0,151	Liječenje mukozitisa	0,377	0,122	Kardiovaskularno analeptičko	0,335	0,047

Aktivnost spoja 9	Pa_9	Pi_9	Aktivnost spoja 10	Pa_10	Pi_10	Aktivnost spoja 11	Pa_11	Pi_11	Aktivnost spoja 12	Pa_12	Pi_12
Biološka meta			***Biološka meta***			***Biološka meta***			***Biološka meta***		
Agonist interleukina 2	0,555	0,009	Inhibitor biosinteze stanične stijenke	0,336	0,010	Inhibitor histidin kinaze	0,544	0,022	Inhibitor 2,3-dihidroksiindol 2,3-dioksigenaze	0,485	0,013
Inhibitor biosinteze stanične stijenke	0,313	0,018	Inhibitor beta laktamaze	0,291	0,007	Stimulant unosa 5-hidroksitriptamina	0,524	0,024	Inhibitor kvercetin 2,3-dioksigenaze	0,453	0,009
Inhibitor sinteze leukotriena	0,285	0,016	Inhibitor MAP kinaze	0,216	0,004	Supstrat CYP2A11	0,490	0,018	Antagonist GABA C receptora	0,304	0,014
Stimulant ATP-aze	0,280	0,036	Inhibitor estradiol 17 beta dehidrogenaze 2	0,124	0,009	Agonist apoptoze	0,414	0,067	Inhibitor ciklooksigenaze	0,244	0,018
Farmakološko djelovanje			Inhibitor protokolagen prolil hidroksilaze	0,117	0,004	***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***		
Liječenje makularne degeneracije	0,306	0,007	***Farmakološko djelovanje***			Koleretik	0,284	0,039	Liječenje makularne degeneracije	0,237	0,023
Liječenje raka prostate	0,298	0,042	Antineoplastik	0,665	0,032	Hemostatik	0,251	0,051	Hemostatik	0,254	0,049
Antivirusno (rinovirus)	0,361	0,141	Antineoplastik (rak dojke)	0,596	0,011	Vazodilatator	0,279	0,082	Antioksidans	0,184	0,066

Aktivnost spoja 13	Pa_13	Pi_13	Aktivnost spoja 14	Pa_14	Pi_14	Aktivnost spoja 15	Pa_15	Pi_15	Aktivnost spoja 16	Pa_16	Pi_16
Biološka meta			***Biološka meta***			***Biološka meta***			***Biološka meta***		
Inhibitor P-benzokinon reduktaze (NADPH)	0,602	0,011	Supstrat CYP2C12	0,834	0,028	Inhibitor ksantin oksidaze	0,216	0,024	Supstrat CYP2A11	0,651	0,008
Inhibitor kvercetin 2,3-dioksigenaze	0,478	0,007	Inhibitor histidin kinaze	0,526	0,024	Inhibitor MAO B	0,113	0,017	Supstrat UGT1A6	0,589	0,009
Inhibitor otpuštanja medijatora	0,475	0,019	Antagonist tromboksana B2	0,519	0,024	Antagonist glutamata (mGluR1)	0,124	0,015	Inhibitor kinaze	0,537	0,028
Supstrat CYP2A10	0,388	0,008	Stimulator unosa 5-hidroksitriptamina	0,496	0,036	Interkalator DNA	0,101	0,031	Inhibitor aril-alkohol dehidrogenaze (NADP+)	0,304	0,022
Farmakološko djelovanje			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***		
Antineoplastik (rak dojke)	0,711	0,005	Antimutagenik	0,323	0,036	Liječenje gastroezofagealnog refluksa	0,119	0,024	Antineoplastik (rak dojke)	0,745	0,005
Antiseboroik	0,452	0,081	Antiekcematik	0,419	0,185	Antineoplastik (rak debelog crijeva)	0,139	0,087	Antineoplastik (rak vrata maternice)	0,362	0,012
Protuupalno	0,417	0,087	Antiuremik	0,267	0,047	Liječenje krhkosti kapilara	0,151	0,020	Antimikobakterijsko	0,435	0,031

Aktivnost spoja 17	Pa_17	Pi_17	Aktivnost spoja 18	Pa_18	Pi_18	Aktivnost spoja 19	Pa_19	Pi_19
Biološka meta			***Biološka meta***			***Biološka meta***		
Supstrat UGT1A6	0,604	0,009	Inhibitor kreatin kinaze	0,262	0,010	Stimulant unosa 5-hidroksitriptamina	0,580	0,009
Inhibitor migracije makrofagnog inhibitornog faktora	0,327	0,004	Inhibitor testosteron 17 beta dehidrogenaze	0,260	0,020	Inhibitor P-benzokinon reduktaze (NADPH)	0,519	0,018
Inhibitor estradiol 17 beta dehidrogenaze 2	0,318	0,003	Inhibitor NAD(P)H dehidrogenaze (kvinon)	0,222	0,005	Inhibitor alkohol dehidrogenaze [NAD(P)+]	0,414	0,010
Antagonist vaskularnog endotelnog faktora rasta 1	0,284	0,005	Inhibitor protein-tirozin fosfataze 2C	0,112	0,009	Inhibitor migracije makrofagnog inhibitornog faktora	0,335	0,004
Farmakološko djelovanje			***Farmakološko djelovanje***			***Farmakološko djelovanje***		
Antineoplastik (sarkom)	0,197	0,060	Antianemik	0,196	0,015	Antineoplastik (rak vrata maternice)	0,258	0,026
Protiv leukemije	0,305	0,043	Antimikobakterijski	0,386	0,043	Protiv leukemije	0,262	0,056
Antineoplastik (rak vrata maternice)	0,338	0,014	Antiuremik	0,345	0,025	Liječenje poremećaja menopauze	0,305	0,116

5.ZAKLJUČCI

- 3-azido-7-hidroksikumarin (**2)** pripravljen je višestupnjevitom reakcijom bez izolacije međuprodukta 3-acetamido-7-acetilkumarina. Perkinovom reakcijom 2,4-dihidroksibenzaldehida s *N*-acetilglicinom te potom *in-situ* deacetiliranjem i nitriranjem dobiveni 3-nitro-7-hidroksikumarin je u konačnici preveden s NaN_3 u 3-azido-7-hidroksikumarin (**2)**.

- Mikrovalovima potpomognutom „klik" reakcijom 3-azido-7-hidroksikumarina (**2**) s odgovarajućim alkilnim i arilnim terminalnim alkinima uz Cu kao katalizator sintetizirani su 1,2,3-triazolni derivati kumarina (**3**-**20)**.

- Sonogashira-inom reakcijom unakrsnog povezivanja 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina s odgovarajućim arilnim terminalnim alkinima uz katalizator $Pd(PPh_3)_4$ i CuI kao kokatalizator pripravljeni su 3-ariletinil-7-hidroksi-4-metil kumarini **21** i **22**.

- „One-pot" reakcijom 7-hidroksi-3-klor-4-metilkumarina, NaN_3, L-prolina i NaOH u EtOH/H_2O (7:3) ili DMSO-u nije sintetiziran 3-azido-7-hidroksi-4-metilkumarin koji je trebao poslužiti kao početni spoj za „klik" reakcije.

- Strukture novopripravljenih spojeva potvrđene su ^{1}H NMR spektroskopijom.

- Spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom. Emisijski spektri 1,2,3-triazolnih derivata kumarina **3**, **8**-**10**, **12**-**20** pokazuju da uvođenje 1,2,3-triazolnog prstena u položaj 3 kumarina povećava intenzitet emisije (Stokes-ov pomak ~ 100 nm).

- Farmakološki učinci i moguće biološke mete predviđene su *in silico* analizom (PASS).

- Novosintetiziranim spojevima biti će ispitana antioksidativna i antitumorska aktivnost na tumorskim staničnim linijama porijeklom iz čovjeka.

6.LITERATURA

1. 1.Y. Kawakita, K. Miwa, M. Seto, H. Banno, Y. Ohta, T. Tamura, T. Yusa, H. Miki, H. Kamiguchi, Y. Ikeda, T. Tanaka, K. Kamiyama i T. Ishikawa *Bioorg. Med. Chem.* 2012 (**20**) 6171.
2. F. G. Medina, J. G. Marrero, M. Macias-Alonso, M. C. Gonzalez, I. Cordova-Guerrero, A. G. Teissier Garcia, S. Osegueda-Robles *Nat. Prod. Rep.* 2015 (**32**) 1472-1507.
3. W. Zhang, Z. Li, M. Zhou, F. Wu, X. Hou, H. Luo, X. Han, G. Yan, Z. Ding, R. Li *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014 (**24**) 799-807.
4. L. Liang i D. Astruc *Coordination Chemistry Reviews* 2011 (**225**) 2933-2945.
5. K.N. Venugopala, V. Rashmi i B.Odhav *BioMed Research International* 2013 (**2013**) 1-14.
6. M. Molnar i M. Čačić, *Croat. J. Food Sci. Technol.* 2011 (**2**) 55-64.
7. N.B. Piller *British journal of experimental pathology* 1975 (**56**) 554-560.
8. G.J. Huang, J.S. Deng i J.C. Liao *J. Agric. Food Chem.* 2012 (**60**) 1673-1681.
9. S.K. Poole i C.F. Poole *Analyst* 1994 (**119**) 113-120.
10. M. Gellert, M.H. O'Dea, T. Itoh i J.I. Tomizawa *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976 (**73**) 4474-4478.
11. A.D. Patil, A.J. Freyer i D.S. Eggleston *J. Med. Chem.* 1993 (**36**) 4131-4138.
12. W.K. Whang, H.S. Park i I. Ham *Exp. Mol. Med.* 2005 (**37**) 436-446.
13. S. Sandhu, Y. Bansal, O. Silakari i G. Bansal *Bioorg. Med. Chem.* 2014 (**15**) 3806-3814.
14. T. Nasr, S. Bondock i M. Youns, *Eur. J. Med. Chem.* 2014 (**76**) 539-548.
15. R. Vazquez, M.E. Riveiro, M. Vermeulen, C. Mondillo, P.H. Coombes, N. R. Crouch, F. Ismail, D. A. Mulholland, A. Baldi i C. Shayo *Phytomedicine* 2012 (**19**) 737-746.
16. N. Kumar, A. Bhatnagar i R. Dudhe *Arabian J. Chem.* 2013 (**15**) 776-782.
17. R. Pan, Y. Dai, X.H. Gao, D. Lu i Y.F. Xia *Vascul. Pharmacol.* 2011 (**54**) 18-26.
18. L. Ranganatha, F. Zameer, S. Meghashri, N. Rekha, V. Girish, H. Gurupadaswamy i S.A. Khanum *Arch. Pharm.* 2013 (**346**) 901-909.
19. B.R. Kusuma, A. Khandelwal, W. Gu, D. Brown, W. Liu, G. Vielhauer, J. Holzbeierlein i B.S.J. Blagg *Bioorg. Med. Chem.* 2014 (**22**) 1441-1451.
20. T. Zhang, Z. Yan, Y.F. Li i N. Wang *Chinese Chem. Lett.* 2013 (**24**) 719-726.
21. M. Ruden i N. Puri *Cancer Treat. Rev.* 2013 (**39**) 444-456.
22. X.Q. Wu, C. Huang, Y.M. Jia, B.A. Song, J. Li i X.H. Liu *Eur. J. Med. Chem.* 2013 (**32**) 6565-6575.

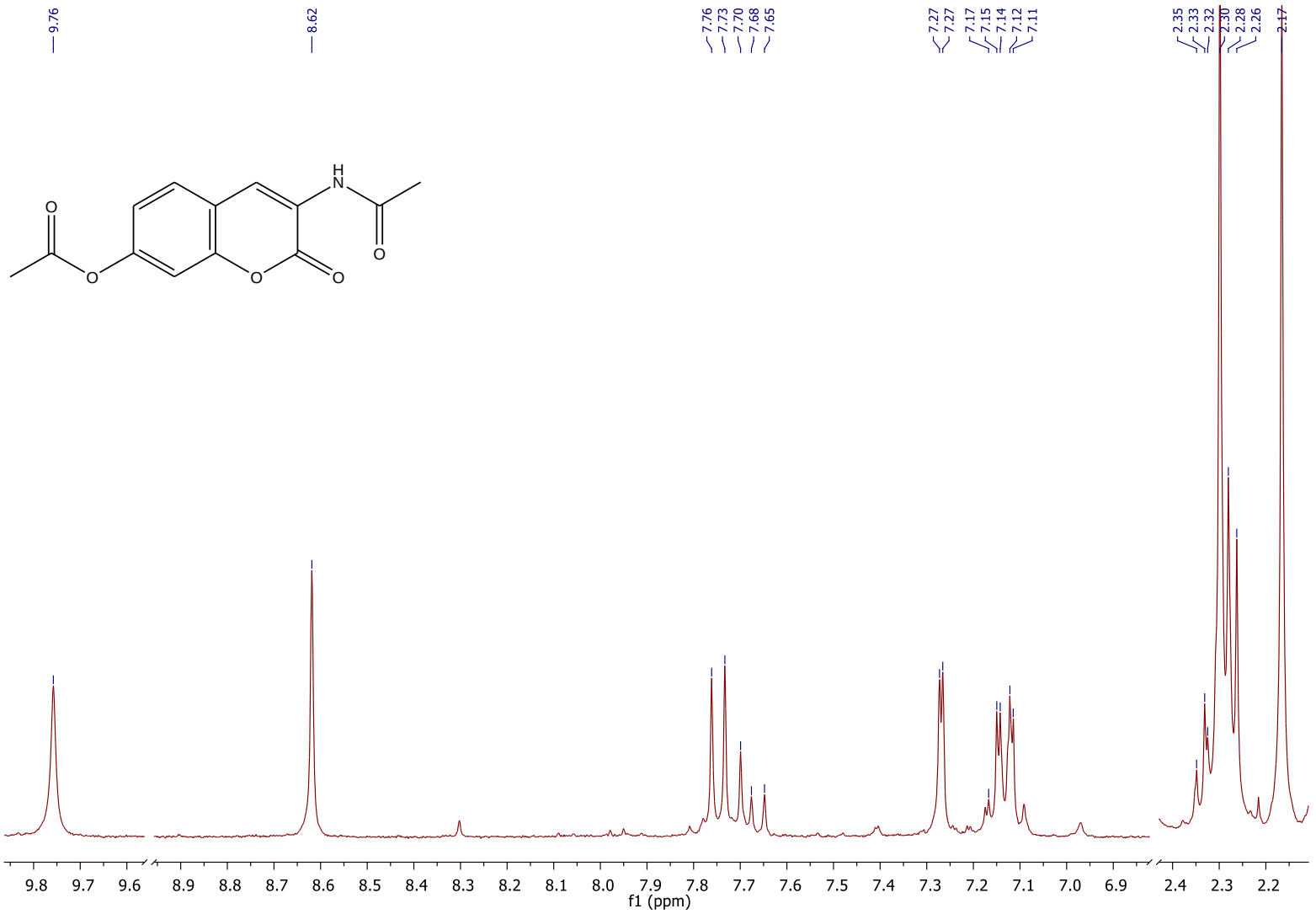
23. N.H. Kim, S.N. Kim, J.S. Oh, S. Lee i Y.K. Kim *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 (**418**) 616-621.
24. D.V. Tsyganov, N.B. Chernysheva, L.K. Salamandra, L.D. Konyushkin, O.P. Atamanenko, M.N. Semenova i V.V. Semenov *Mendeleev Commun.* 2013 (**23**) 147-158.
25. C. Fabrizio, M. Alfonso, S. Andrea i C. Supuran *Bioorg. Med. Chem.* 2012 (**20**) 2266-2273.
26. Z.C. Wang, Y.J. Qin, P.F. Wang, Y.A. Yang, Q. Wen, X.H.Y. Zhang, Qiu, Y.T. Duan, Y.T. Wang i Y.L. Sang *Eur. J. Med. Chem.* 2013 (**66**) 1-12.
27. N. Draoui, O. Schicke, E. Seront, C. Bouzin, P. Sonveaux, O. Riant i O. Feron *Mol. Cancer Ther.* 2014 (**13**) 1410-1415.
28. N. Draoui, O. Schicke, A. Fernandes, X. Drozak, F.Nahra, A. Dumont, J. Douxfils, E. Hermans, J.M. Dogne i R. Corbau *Bioorg. Med. Chem.* 2013 (**21**) 7107-7112.
29. D. Chanti Babu, B. Rao, D. Ramesh, S.R. Swamy i Y. Venkateswarlu *Tetrahedron Lett.* 2012 (**53**) 3633-3640.
30. L. Woo, D. Ganeshapillai, M.P. Thomas, O.B. Sutcliffe, B. Malini, M.F. Mahon, A. Purohit i B.V. Potter *Chem. Med. Chem.* 2011 (**6**) 2019-2024.
31. M. Patel Rajesh i J. Patel Natvar *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research* 2011 (**1**) 52-68.
32. K. Hodak, V. Jakesova i V. Dadak *Cesk. Pharm.* 1964 (**13**) 248-253.
33. K.C. Fylaktakidou, D.J. Hadjipavlou-Litina, K.E. Litinas i D.N. Nicolaides *Curr. Pharm. Des.* 2004 (**10**) 3813-3833.
34. J.A.R. Mead, J.N. Smith i R.T. Williams *Biochem. J.* 1958 (**68**) 67-74.
35. C.C. Chiang, M.J. Cheng, C.F. Peng, H.Y. Huang i I.S. Chen *Chem. Biodivers.* 2010 (**7**) 1728-1736.
36. T. Rosen *Comp. Org. Syn.* 1991 (**2**) 395-408.
37. M. K. Potdar, S. S. Mohile i M. M. Salunkhe *Tetrahedron Lett.* 2001 (**42**) 9285-9287.
38. D. Bogdal *Journal of Chemical Research* 1998 (**30**) 468-469.
39. K. Sivakumar, F. Xie, B.M. Cash, S. Long, H.N. Barnhill i Q. Wang *Organic Letters* 2004 (**6**) 4603-4606.
40. W. Zhu i D. Ma *Chem. Commun.* 2004 (**7**) 888-889.
41. Y.C. Duan, Y.C. Ma, Z. En, X.J. Shi, M.M. Wang, X.W. Ye i H.M. Liu *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013 (**62**) 11-19.

42. I. A. Khan, M. Ahmad, S. Aslam, M. J. Saif, A. F. Zahoor, S. Ali Raza Naqvi i A. Mansha *Afinidad* 2015 (**72**) 569.
43. W. Zhang, Z. Li, M. Zhou, F. Wu, X. Hou, H. Luo, H. Liu, X. Han, G. Yan, Z. Ding i R. Li *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014 (**24**) 799-807.
44. L. Krstulović, D. Saftić, J. Matić, M. Bajić i B. Žinić *Kem. Ind.* 2015 (**64**) 499-512.
45. E. Jason Hein i V. Valery Fokin *Chem. Soc. Rev.* 2010 (**39**) 1302-1315.
46. M. Meldal i C.W. Tornoe *Chem. Rev.* 2008 (**108**) 2952-3015.
47. R. Chinchilla i C. Nájera *Chem. Soc. Rev.* 2011(**40**) 5084–5121.
48. S. Nedd i A. N. Alexandrova *Phys. Chem.* 2015 (**17**) 1347-1353.
49. B.N. Mattoo *Trans Faraday Soc.* 1956 (**52**) 1184-1194.
50. H.H. Jaffe i A. L. Miller *J. Chem. Educ.* 1966 (**43**) 469-472.
51. V. Balial, T.R. Seshardi, V. Venkateswarlu *Proceedings of the Indian Academy of Sciences, Section A* 1942 (**16**) 68-82.
52. H. R. Noori, R. Spanagel *In Silico Pharmacology*. 2013 (**1**) 1.
53. http://genexplain.com/pass; pristupljeno: 15.6.2016. (17:30).

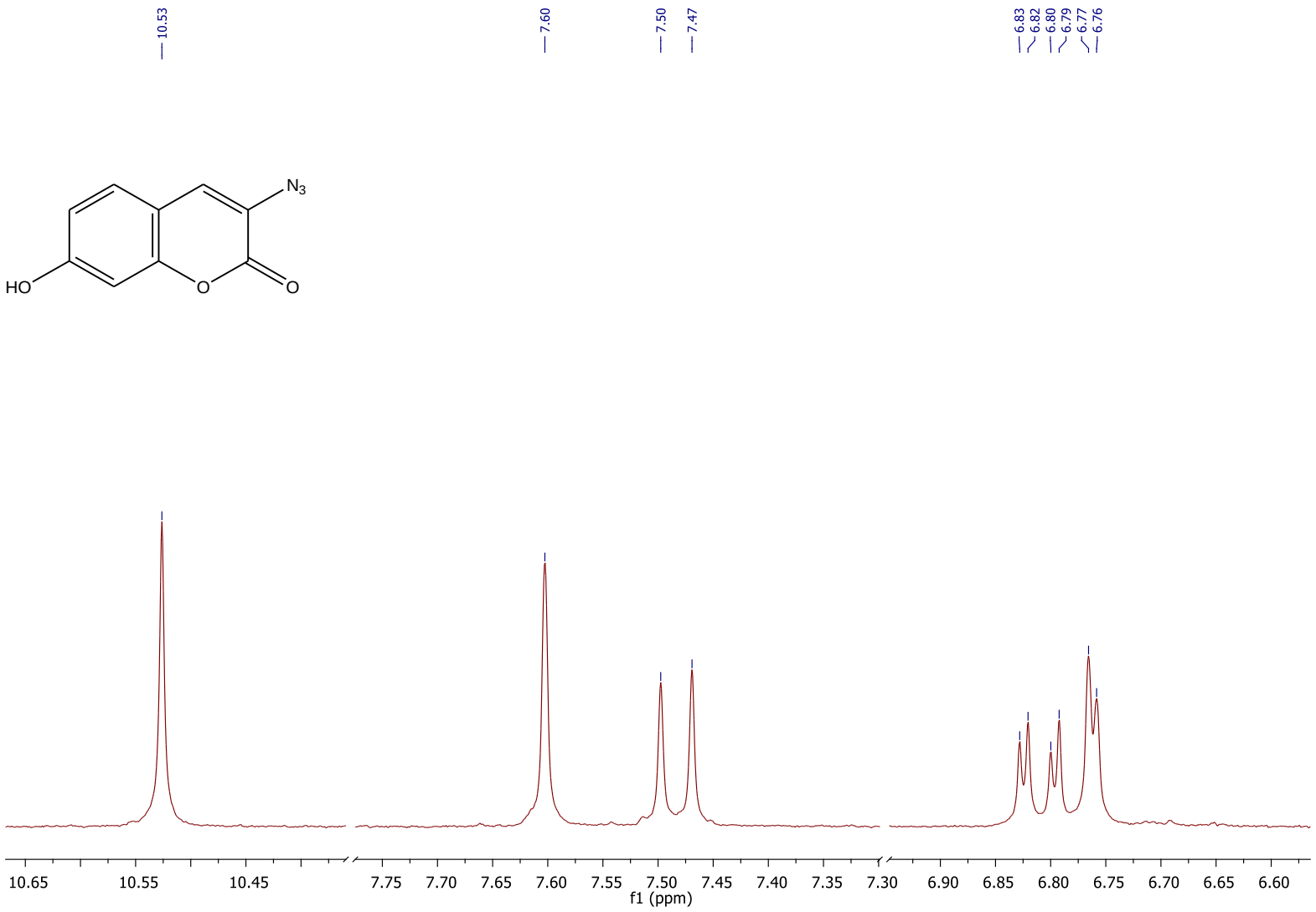
7.ŽIVOTOPIS

Zovem se Mia Krnić, rođena sam u Šibeniku 2.8.1991. Osnovnu školu Tina Ujevića završila sam 2006. u Šibeniku nakon čega upisujem gimnaziju Antuna Vrančića gdje sam nakon četiri godine jezične gimnazije maturirala 2010. godine s odličnim uspjehom. Iste godine upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. U srpnju 2014. obranila sam završni rad pod mentorstvom docentice Lucije Foglar, a u rujnu iste godine upisala sam diplomski studij Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, modul Primijenjena organska kemija. Stručnu praksu odradila sam u Pliva Hrvatska d.o.o, TAPI Unapređenje tehnoloških procesa i podrška proizvodnji (UTPPP), Savski Marof, u razdoblju od 3. ožujka do 28. ožujka 2014 godine. Na XI. susretu mladih kemijskih inženjera, 18. i 19. veljače 2016. godine, sudjelovala sam s posterskim priopćenjem.

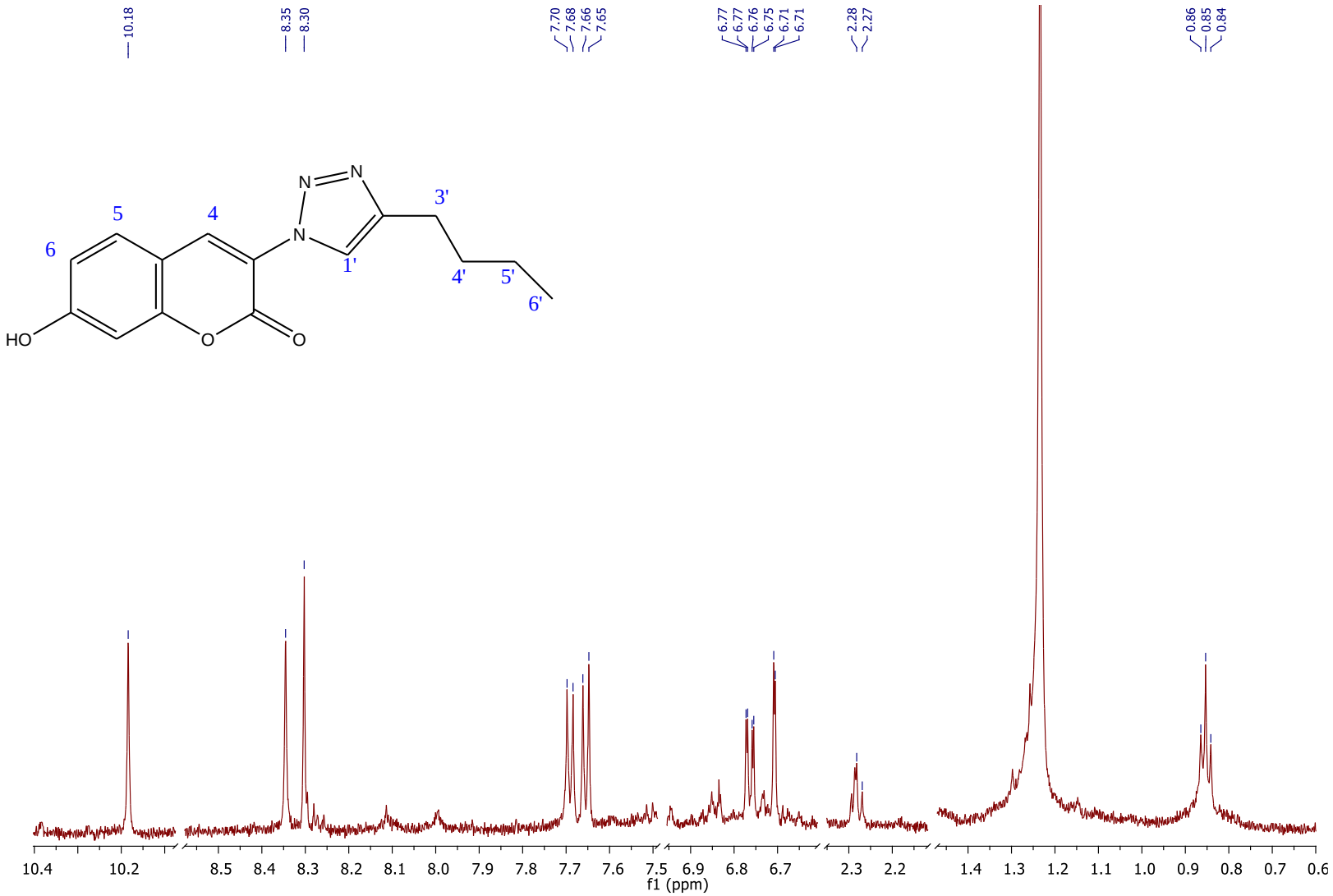
8. PRILOZI



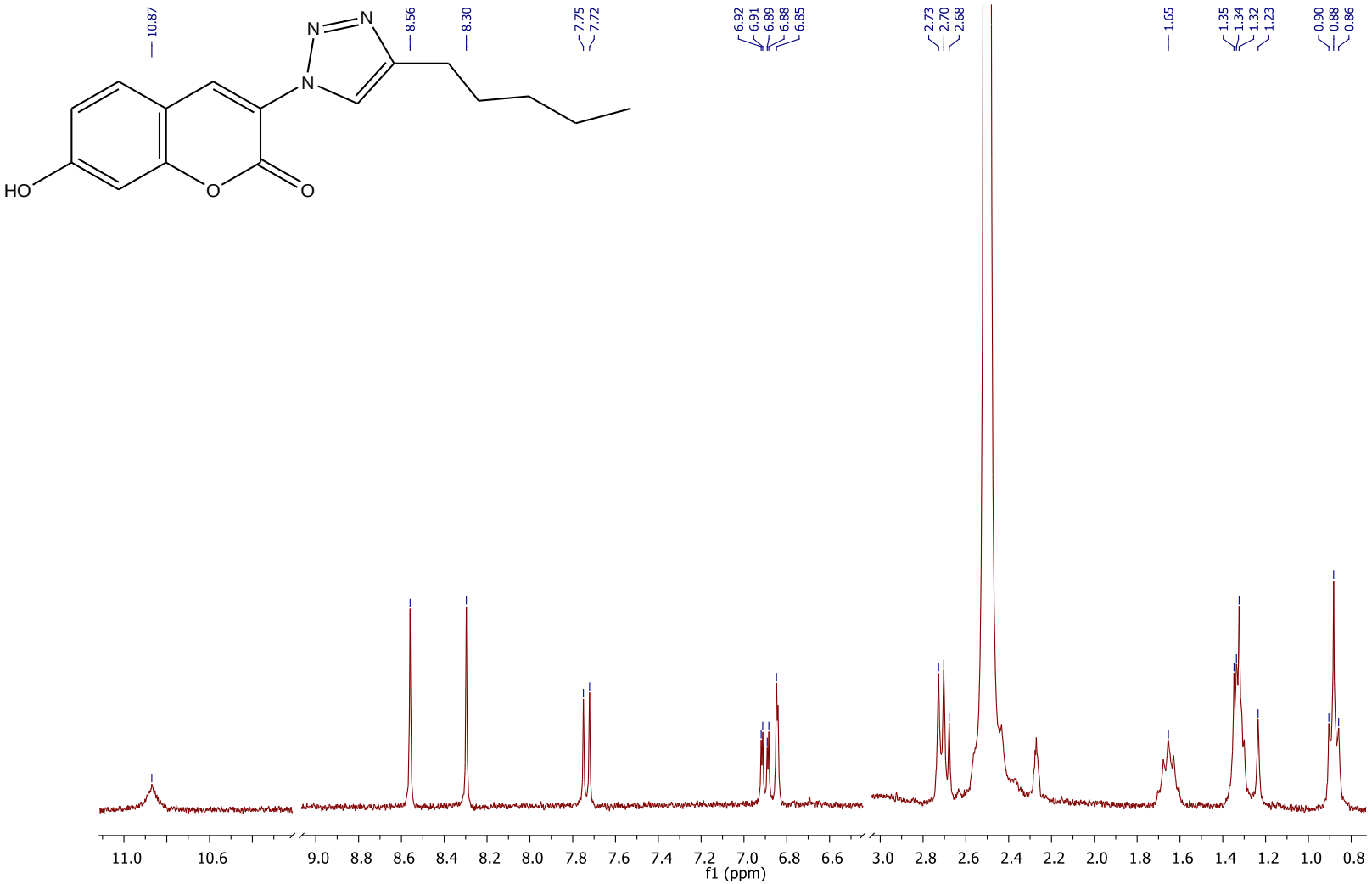
Prilog 1: ^{1}H NMR spektar spoja **1**



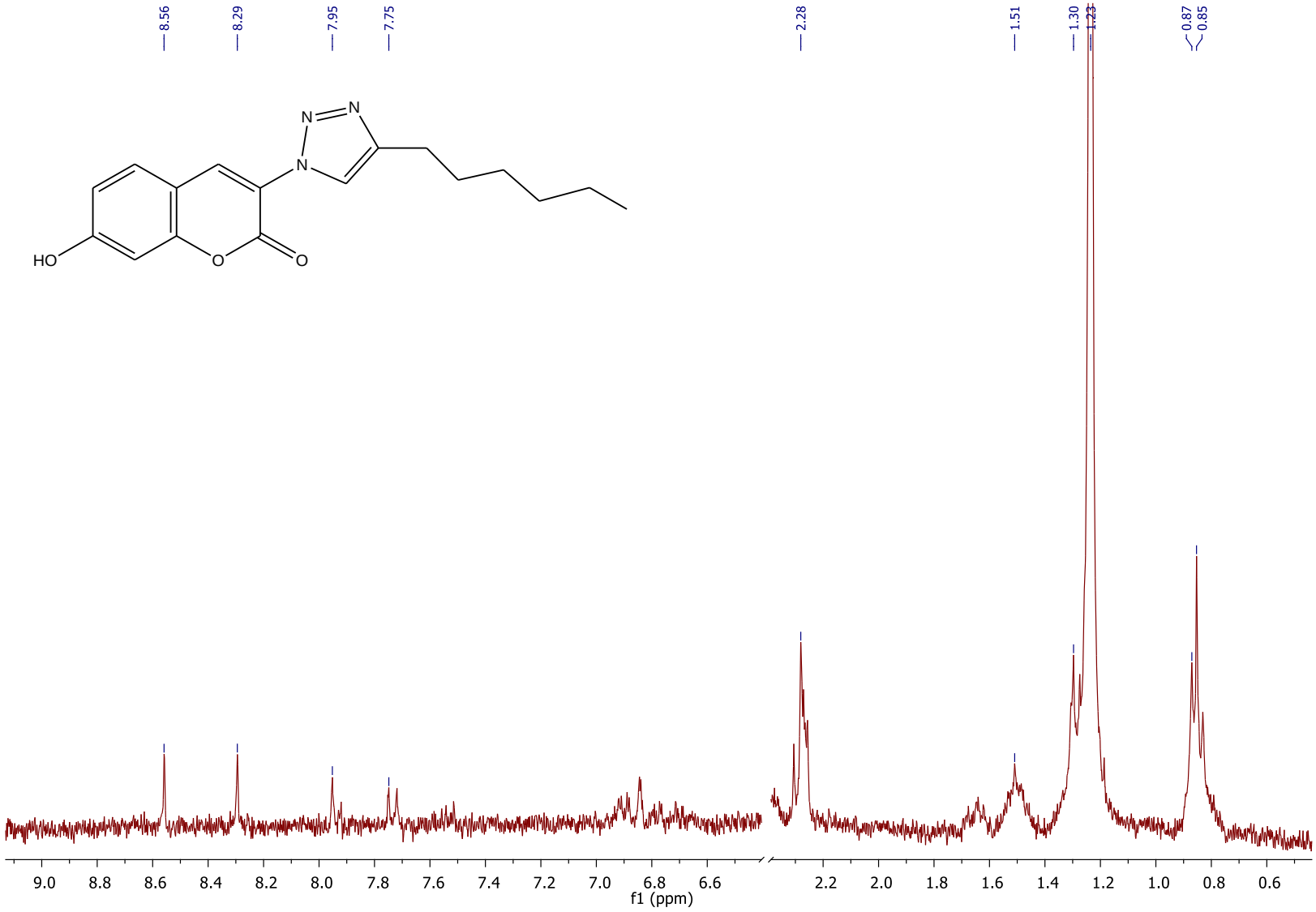
Prilog 2: ^{1}H NMR spektar spoja **2**



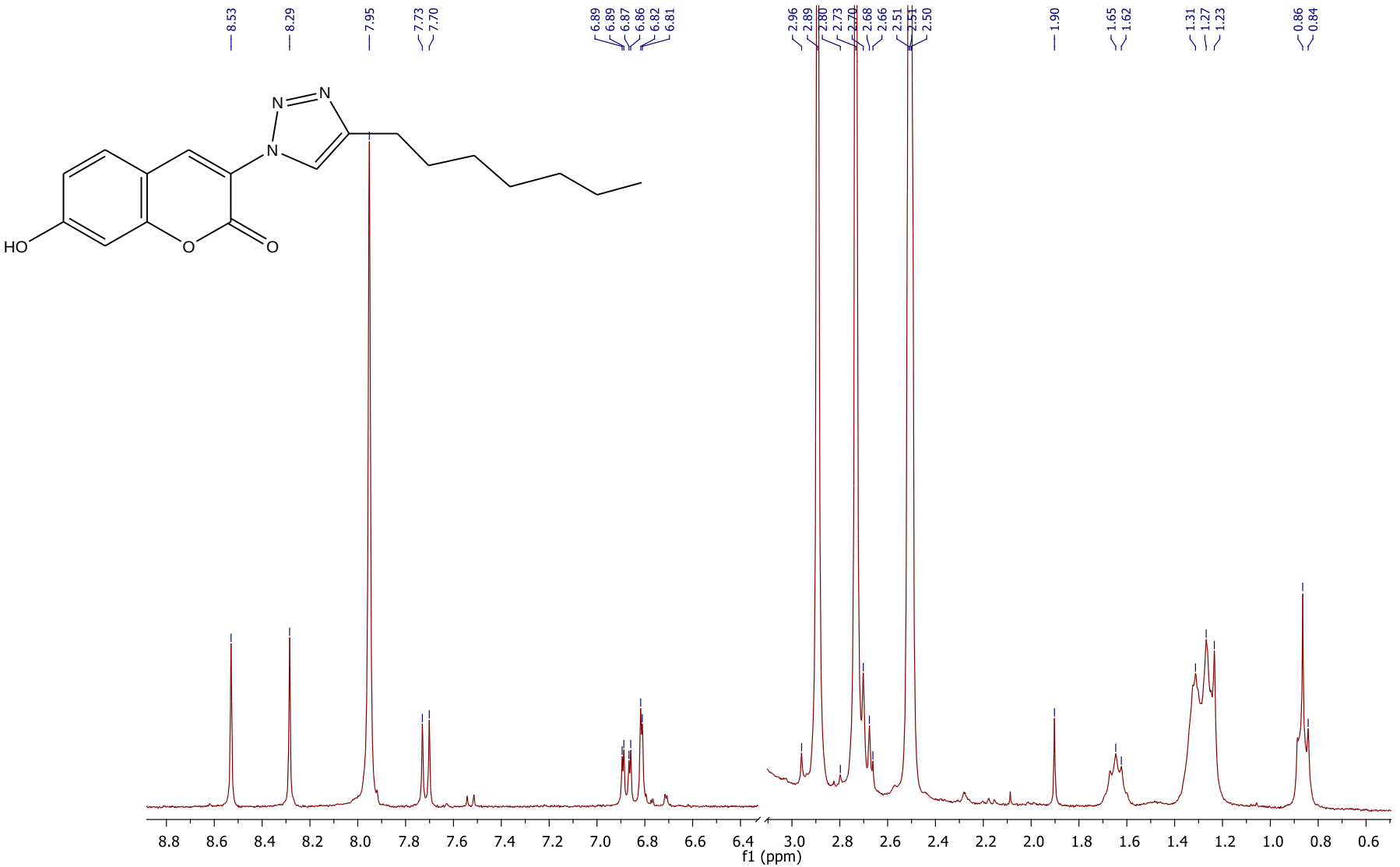
Prilog 3: ^{1}H NMR spektar spoja **3**



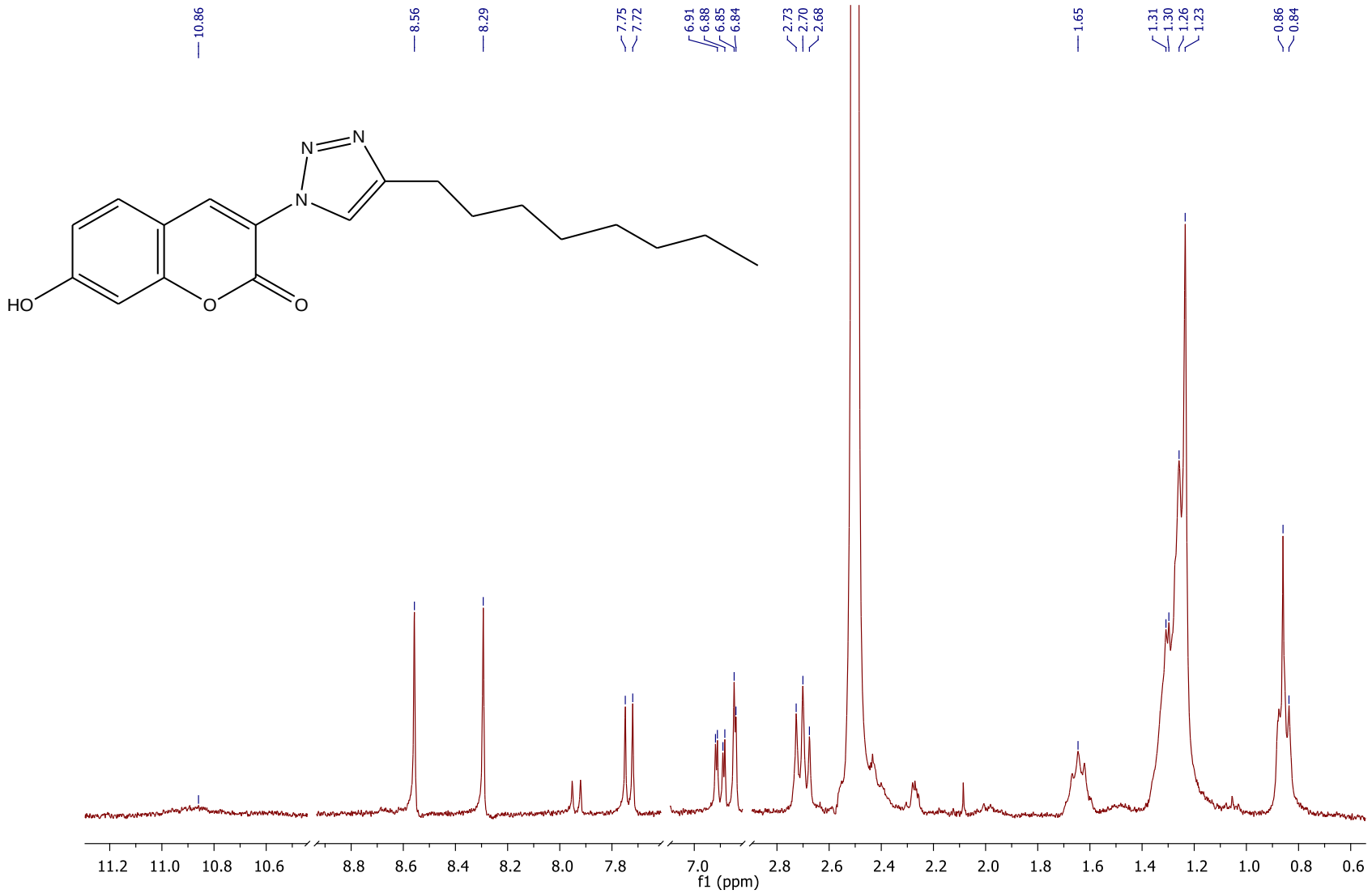
Prilog 4: ^{1}H NMR spektar spoja **4**



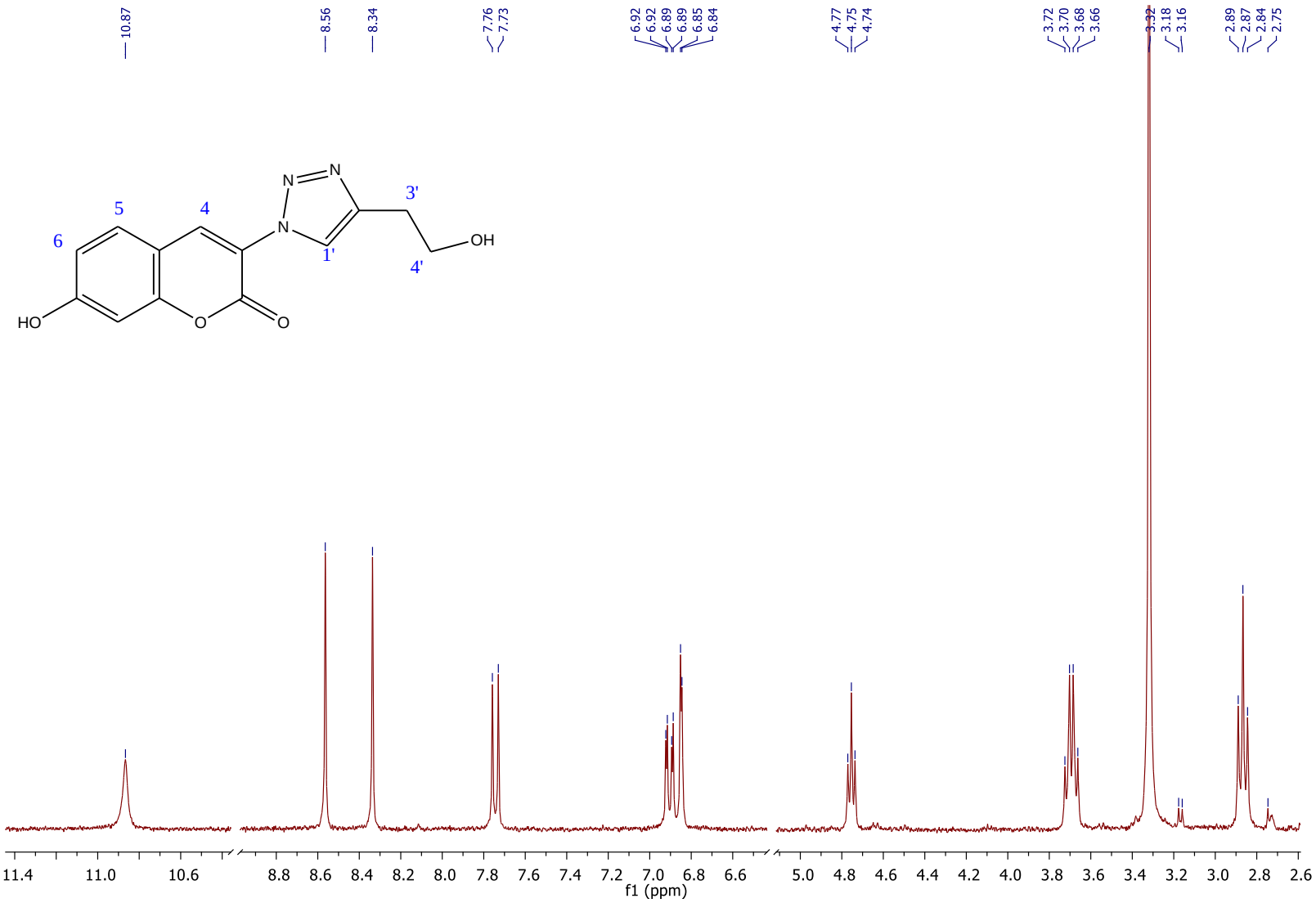
Prilog 5: ^{1}H NMR spektar spoja **5**



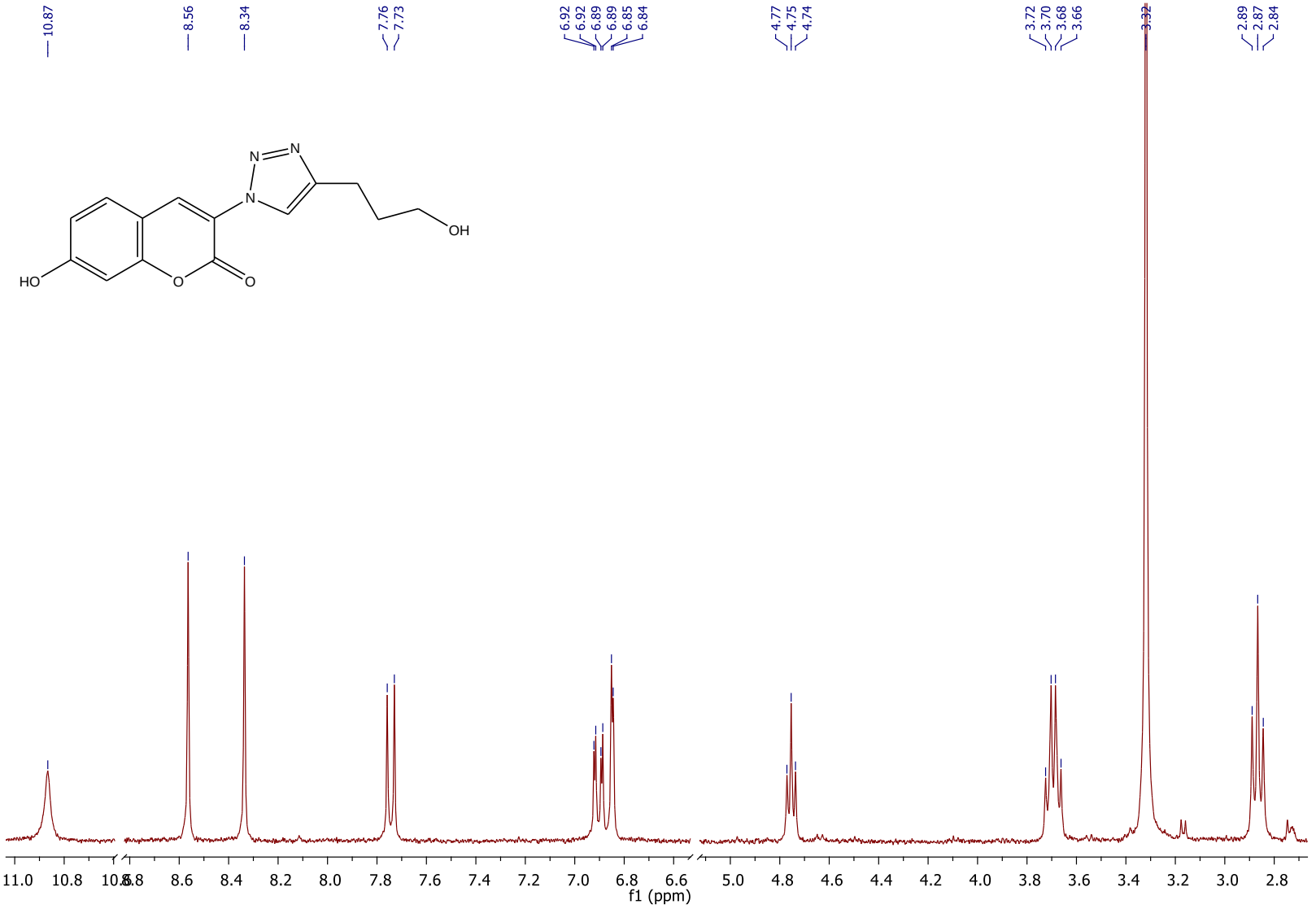
Prilog 6: ^{1}H NMR spektar spoja **6**



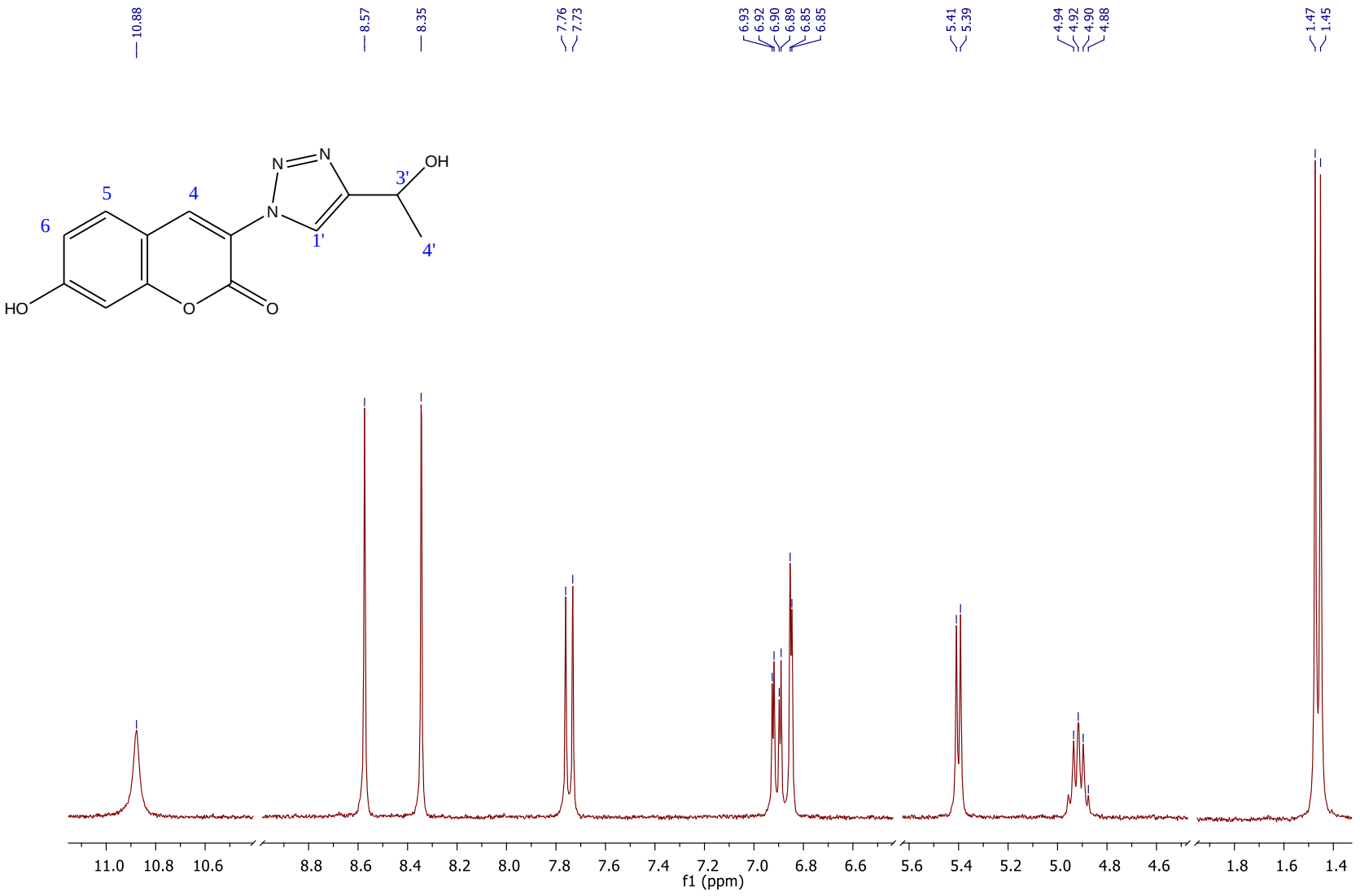
Prilog 7: ^{1}H NMR spektar spoja **7**



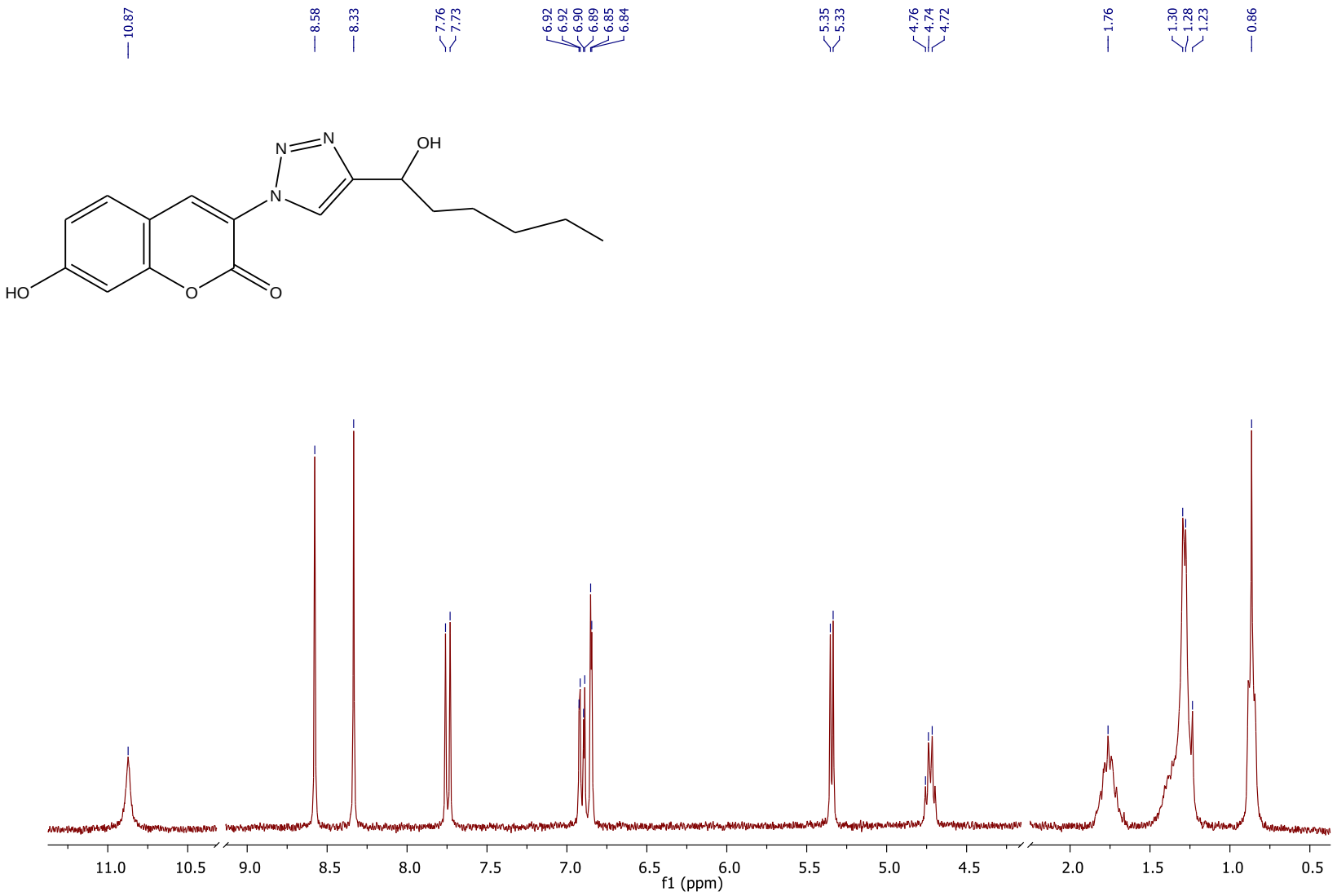
Prilog 8: ^{1}H NMR spektar spoja **8**



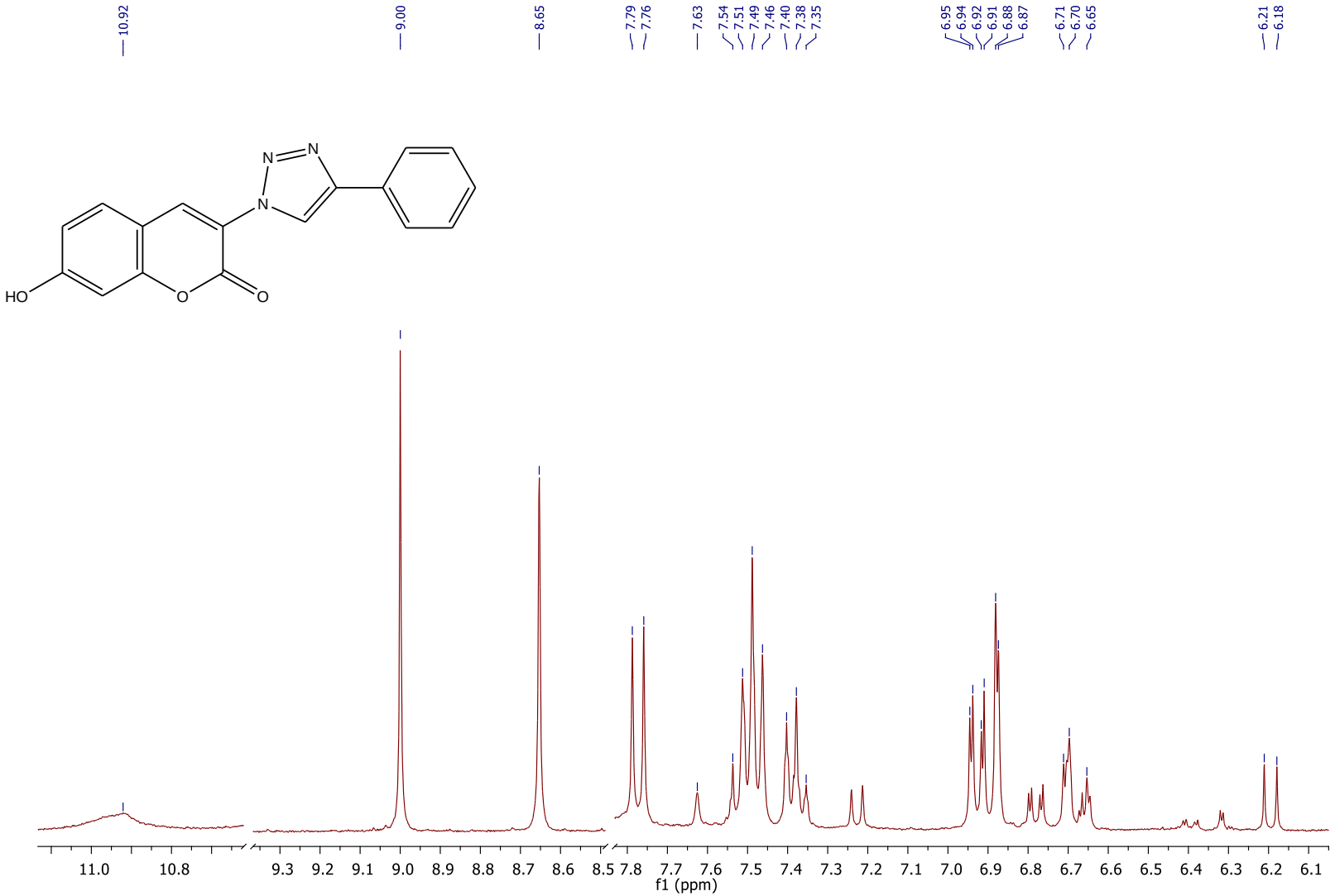
Prilog 9: ^{1}H NMR spektar spoja **9**



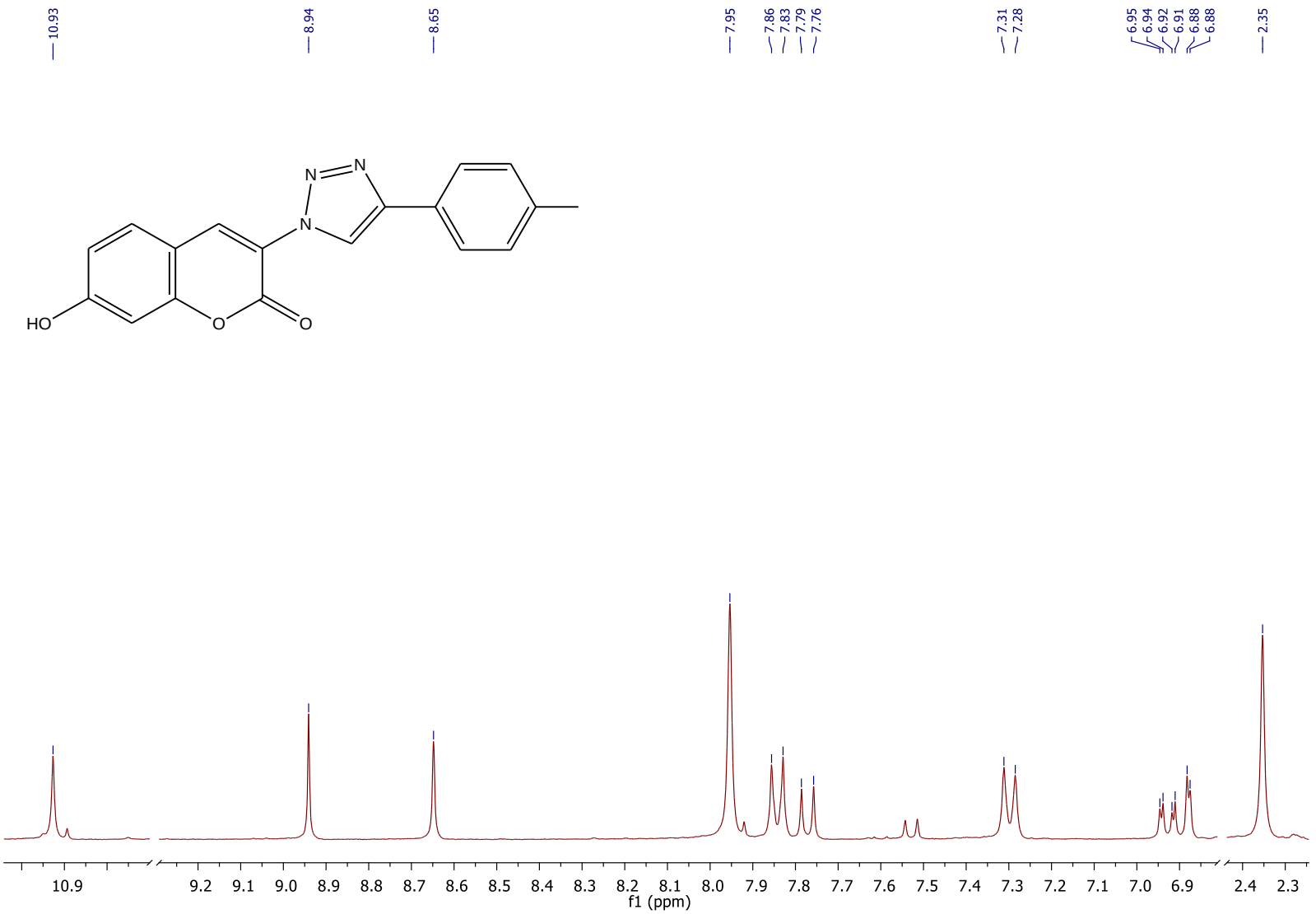
Prilog 10: ^{1}H NMR spektar spoja **10**



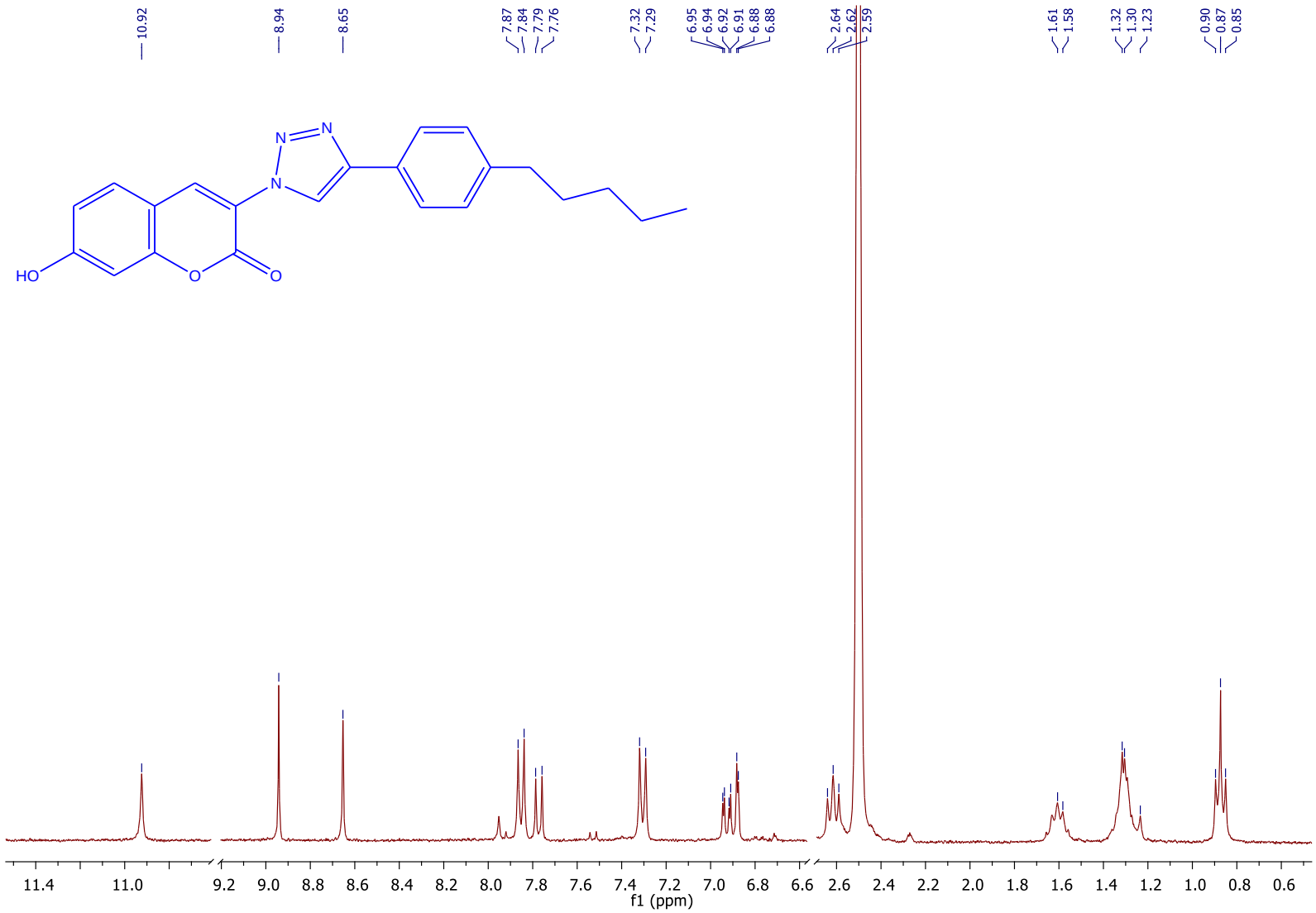
Prilog 11: ^{1}H NMR spektar spoja **11**



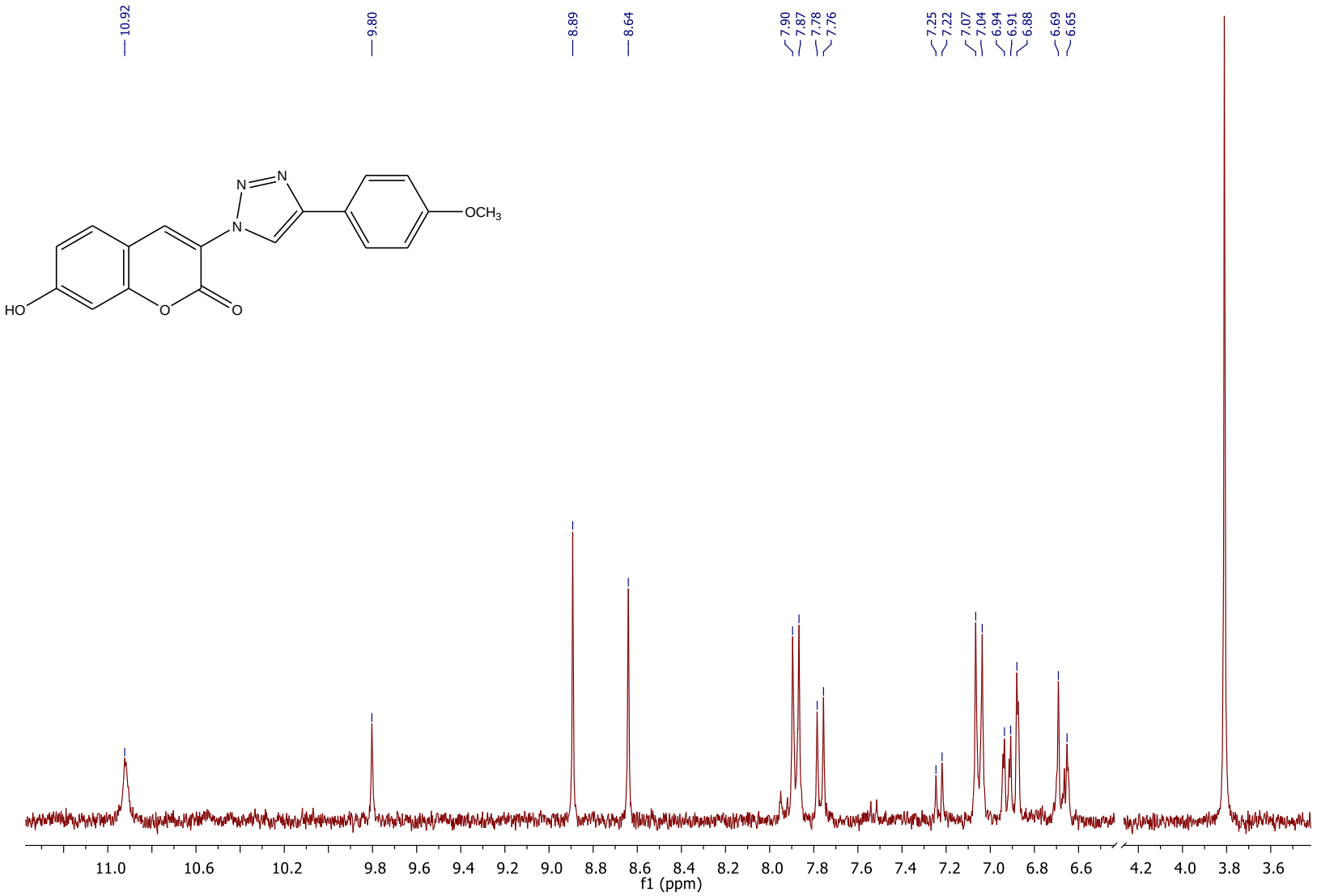
Prilog 12: ^{1}H NMR spektar spoja **12**



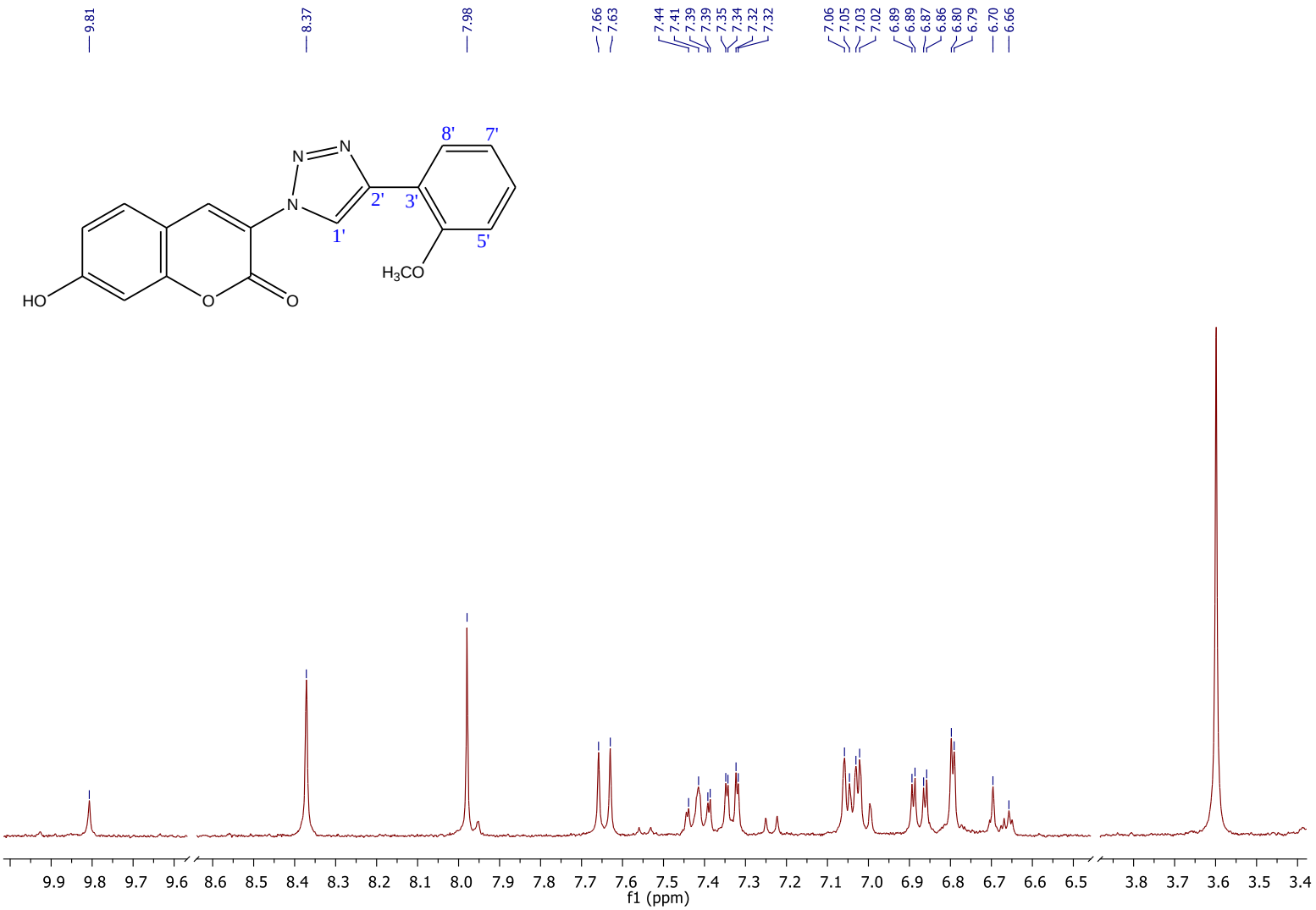
Prilog 13: ^{1}H NMR spektar spoja **13**



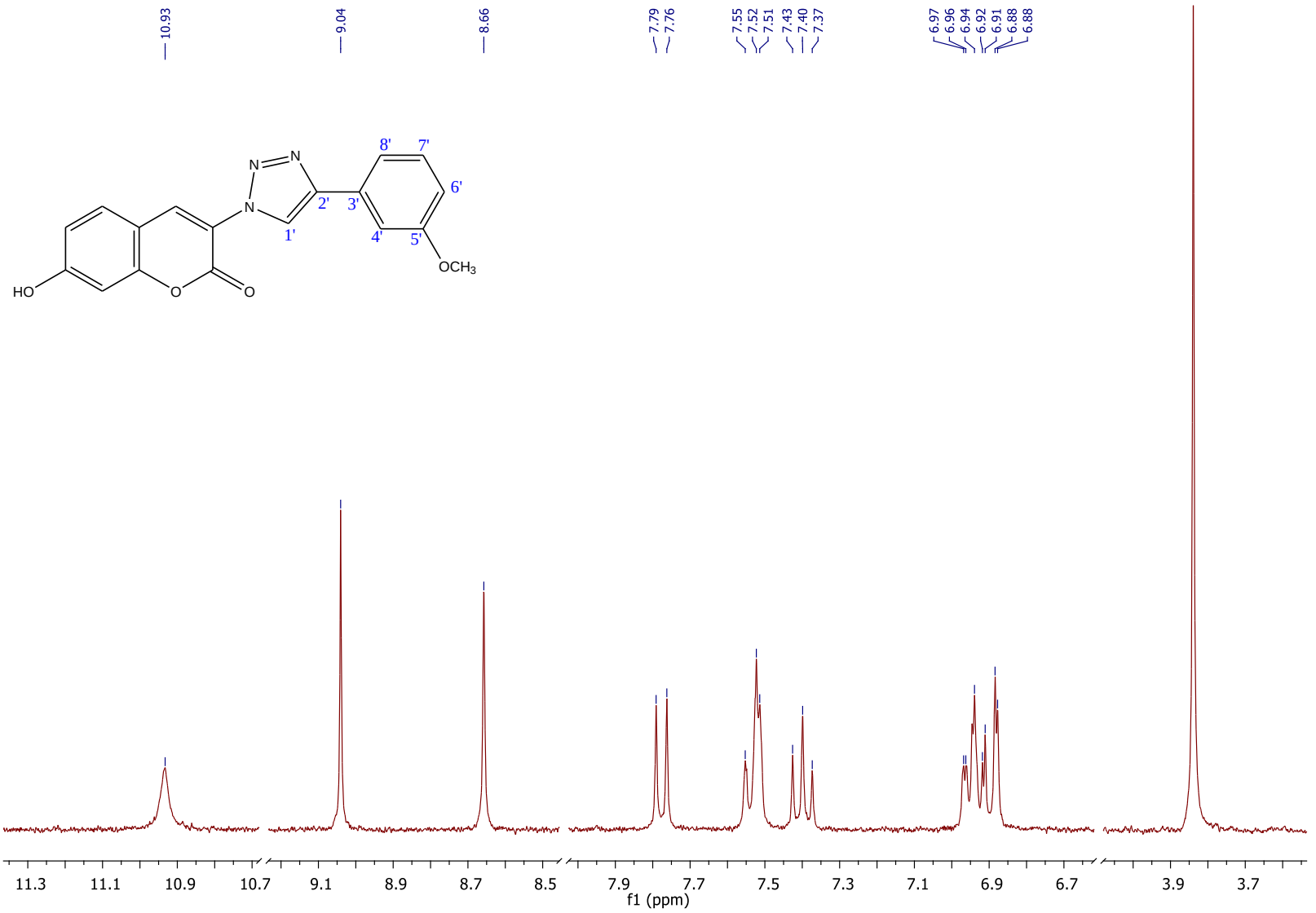
Prilog 14: ^{1}H NMR spektar spoja **14**



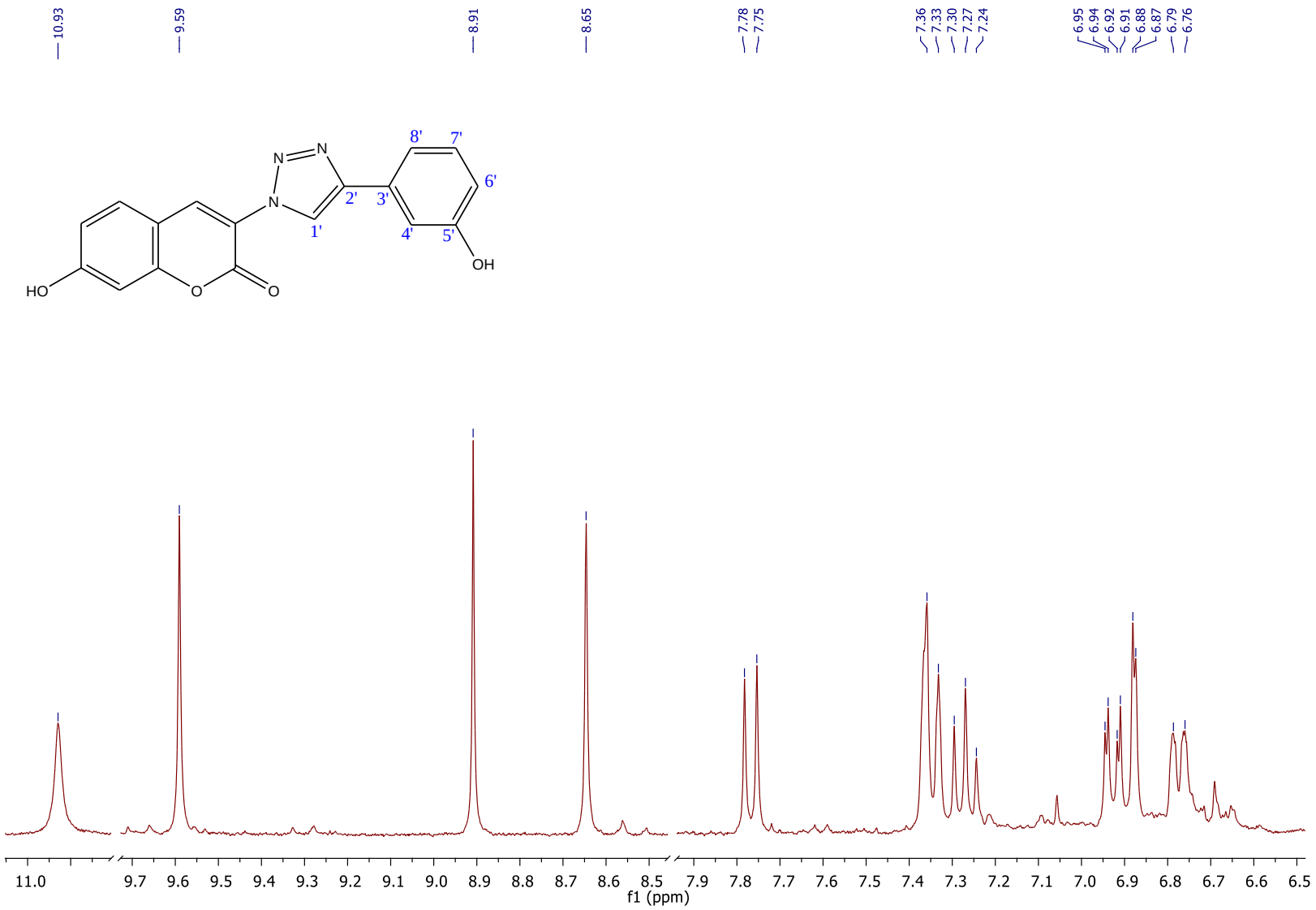
Prilog 15: ^{1}H NMR spektar spoja **15**



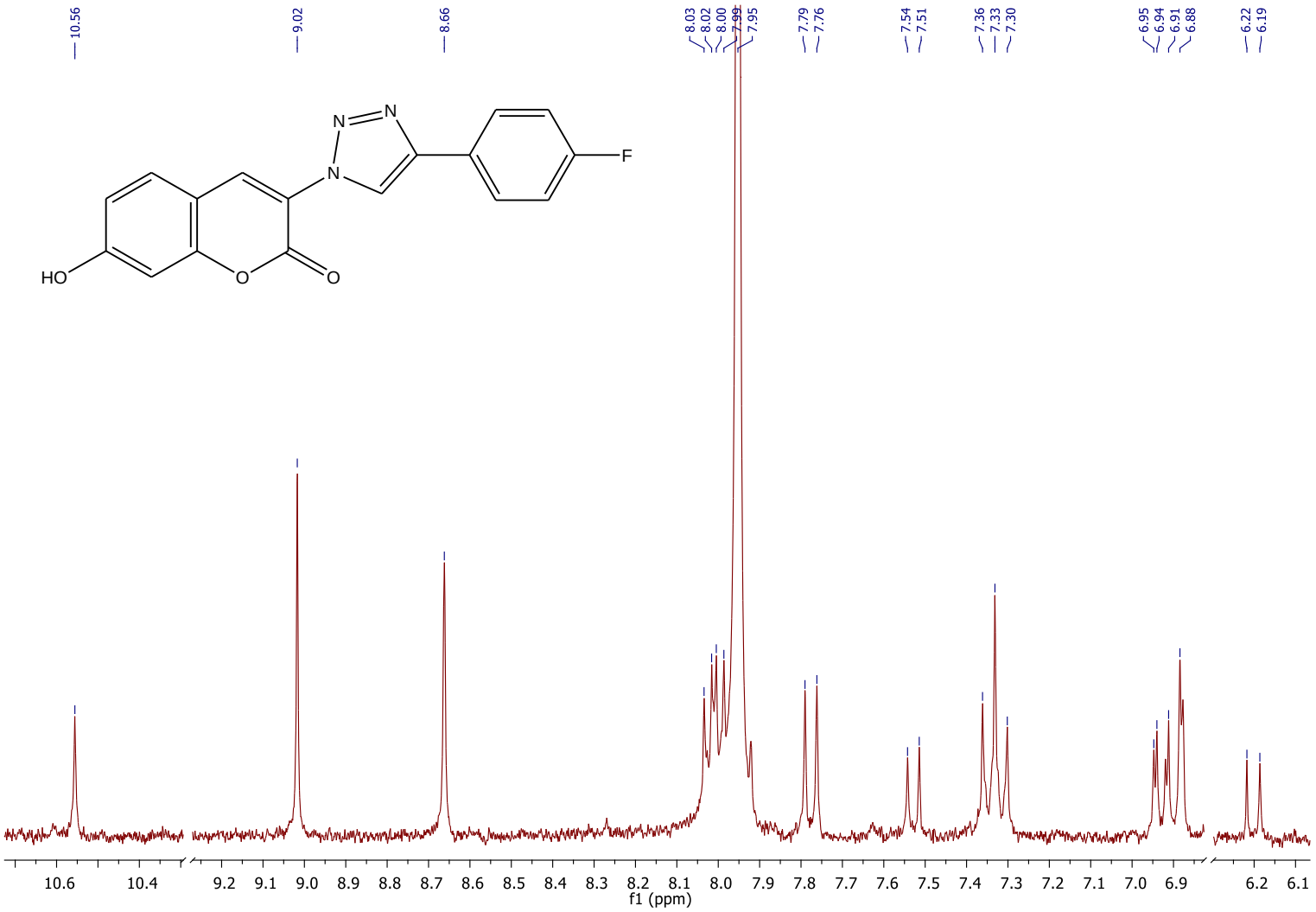
Prilog 16: ^{1}H NMR spektar spoja **16**



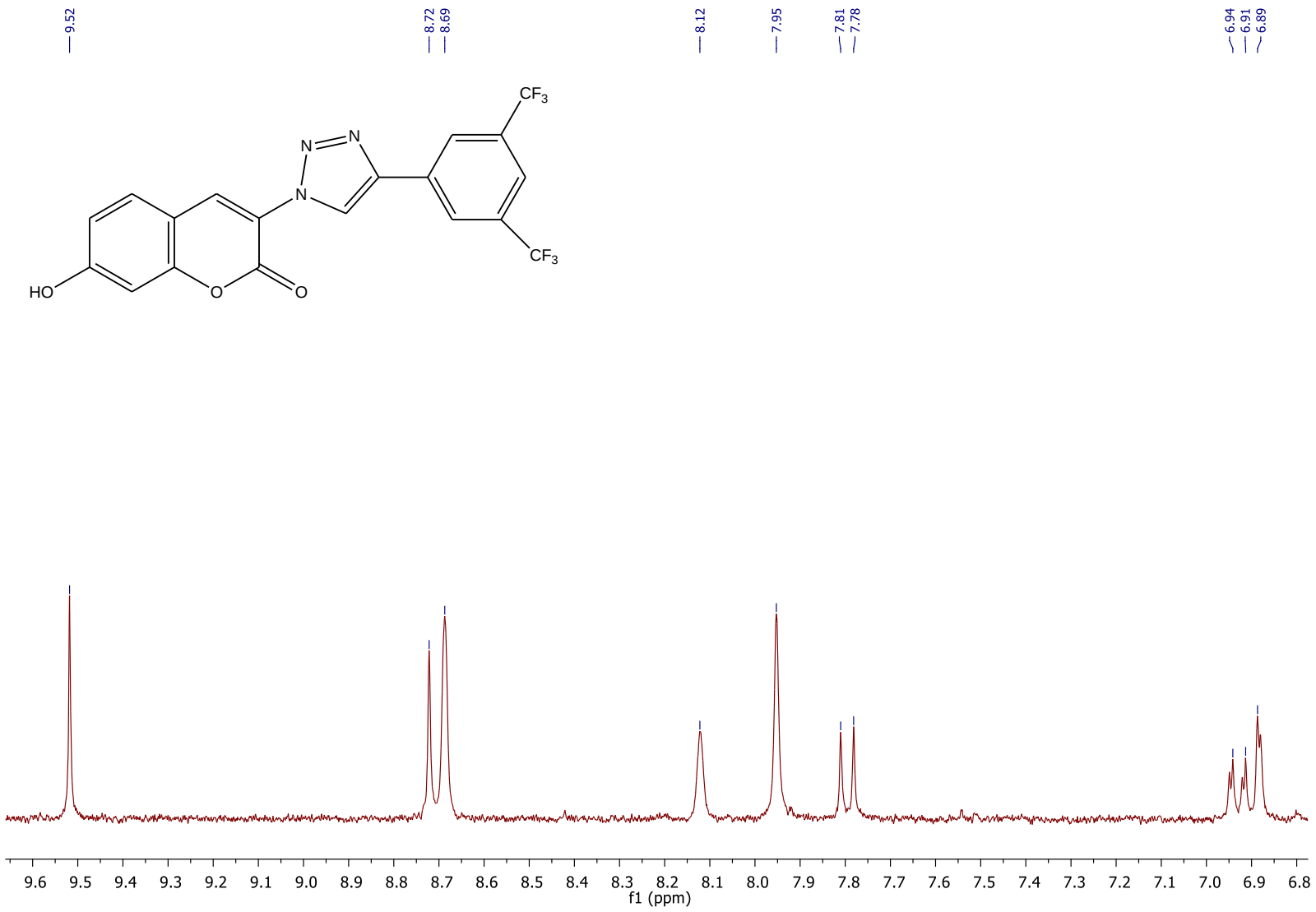
Prilog 17: ^{1}H NMR spektar spoja **17**



Prilog 18: ^{1}H NMR spektar spoja **18**



Prilog 19: ^{1}H NMR spektar spoja **19**



Prilog 20: ^{1}H NMR spektar spoja **20**